

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie alimentaire-sanitaire

Thème

Activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* à l'égard des
Pseudomonas spp contaminants des fromages frais de chèvre et essai de
valorisation du lactosérum

Réalisé par

Mr ADRAR Massine

Devant le jury

Président : Mr **KECHA M.**

Examineur 1: Mr **NABTI H.**

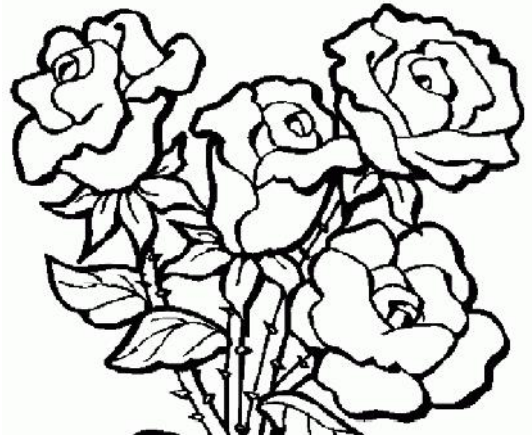
Examineur 2: Mr **BENSAID K.**

Promoteur : Mme **BENACHOUR K.**

Promotion 2012/2013

Remerciements

Avant tout, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la force et le courage ainsi que la patience pour réaliser ce travail



Au terme de ce travail qui constitue le couronnement du stage que j'ai effectué au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée sous la direction de Mme BENACHOUR.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Mme SADOUN D. qui m'a accueilli et permis de réaliser le présent travail au sein de son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent aussi à Melle TITELI et Mr SADOUN pour leur gentillesse et leur sympathie.

Je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs TAZERART Farid et khoudir pour leur soutien et encouragement.



Je remercie enfin tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail.

Dédicace



Je dédie ce modeste travail à :

- Mes très chers parents pour lesquels aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et le respect que j'éprouve pour eux. Puisse ce travail constituer une légère compensation pour tous les nobles sacrifices qu'ils se sont imposés pour assurer mon éducation et mes études,
- Ma grande sœur Maya et son époux Lamari Smail ;
- Ma petite sœur Lamia ;
- Aux familles Adrar et Bouhatmi ;
- Mes meilleurs amis : Farid T., Youcef Z., Said W., Malek B., Nassim B., Nassim B. dit James, Ali et Othman B., Fares O., Lyes K., Mustapha H. et Fares B.



Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 01

Synthèse bibliographique

I. Bactéries lactiques

I.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques..... 02

I.2. Habitat et origine..... 02

I.3. Classification 02

I.4. Caractéristiques de *Lactobacillus plantarum* 03

I.5. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie..... 06

I.6. Rôles et propriétés attendues des bactéries lactiques en fromagerie..... 06

II. Les *pseudomonas*

II.1. Généralités 07

II.2. Habitat..... 08

II.3. Taxonomie..... 09

II.4. Résistance aux antibiotiques 10

III. Lait de chèvre, fromage et lactosérum

III.1. Le lait de chèvre 11

III.2. Le fromage de chèvre 12

III.3. Le lactosérum 14

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail.....	16
2. Matériel biologique.....	16
3. Standardisation des inocula.....	17
4. Criblage des bactéries lactiques.....	20
5. Réalisation de la cinétique de croissance et évolution du pH et de l'acidité Dornic des <i>Pseudomonas spp</i> dans le lait et le lactosérum stérile.....	23
6. Réalisation des antibiogrammes.....	25
7. Essai de fabrication d'un fromage frais de chèvre et réalisation de l'expérience visant à éradiquer les <i>Pseudomonas spp</i> dans ce fromages.....	26

Résultats et discussion

III.1. criblage des souches de bactéries lactiques (test des spots)	30
III.2. Cinétique de croissance et évolution des pH et de l'acidité Dornic pour les <i>Pseudomonas spp</i>	31
III.3. Antibiogrammes	34
III.4. Evolution des poids et du pH des fromages et croissance des <i>pseudomonas spp</i> dans les fromages	36

Conclusion	40
-------------------------	----

Références bibliographiques	41
--	----

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I : Composition du lait de chèvre	12
Tableau II : Composition chimique du lactosérum	15
Tableau III : Rendements fromager des fromages retenus.....	36

Liste des tableaux en annexe

Tableau I : Résultats des mesures du test des spots.....	Annexe I
Tableau II : Evolution de l'acidité titrable et du pH pour <i>Pseudomonas spp</i>	Annexe I
Tableau III : Résultats de dénombrement des <i>Pseudomonas spp</i> dans 200 ml de lait stérile.....	Annexe I
Tableau IV : Résultats de dénombrement des <i>Pseudomonas spp</i> dans 200ml de lactosérum stérile	Annexe I
Tableau V : Résultats de l'analyse microbiologique du lait cru de chèvre	Annexe I
Tableau VI : Résultats du poids des fromages au 1 ^{er} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau VII : Résultats des pH des fromages au 1 ^{er} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau VIII : Résultats du poids des fromages au 7 ^{ème} jour de fabrication	Annexe I
Tableau IX : Résultats des pH des fromages au 7 ^{ème} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau X : Résultats des dénombrements (fromages) au 7 ^{ème} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau XI: Résultats du poids des fromages au 14 ^{ème} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau XII: Résultats du pH des fromages au 14 ^{ème} jour de fabrication.....	Annexe I
Tableau XIII : Résultats des dénombrements (fromages) au 14 ^{ème} jour de fabrication	Annexe I

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique, des bactéries lactiques.....	04
Figure 2 : Dendrogramme de <i>Lb. plantarum</i>	06
Figure 3 : Standardisation de l'inoculum de <i>Lactobacillus Plantarum</i>	18
Figure 4 : Standardisation de l'inoculum des <i>Pseudomonas spp</i>	19
Figure 5 : Schéma illustrant les étapes suivies pour le test des spots.....	22
Figure 6 : Résultat du test des spots de <i>Lb. plantarum</i>	30
Figure 7 : Résultat du test des spots de <i>Lactococcus lactis</i>	30
Figure 8 : Courbes de l'évolution des pH et l'acidité Dornic dans le lait stérile.....	31
Figure 9 : Courbes de l'évolution des pH et l'acidité Dornic dans le lactosérum stérile.....	32
Figure 10 : Courbes de croissance des <i>Pseudomonas spp</i> dans le lait et le lactosérum.....	33
Figure 11 : Résultat de l'antibiogramme de <i>Lb. plantarum</i>	33
Figure 12 : Résultats de l'antibiogramme des <i>Pseudomonas spp</i>	34
Figure 13 : Histogramme de l'évolution des poids des fromages.....	35
Figure 14 : Courbe représentant l'évolution des pH des fromages.....	36
Figure 15 : Histogrammes représentant la croissance des <i>Pseudomonas spp</i> dans les fromages.....	37

Liste des abréviations

BHI : bouillon cœur cervelle

BN : bouillon nutritif ordinaire

1 ml : 1 milliliter

°D: degré Dornic

EMB: gélose éosine bleu de méthylène

FMAT : flore mésophile aérobie totale

GNO : gélose nutritive ordinaire

Lb. plantarum: *Lactobacillus plantarum*

MH : Mueller-Hinton

MRS: De Man, Rogosa et Sharpe

TD : tube digestif

UFC: unité formant colonie

VRBG : gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

Introduction

Introduction

Les producteurs fermiers sont fréquemment confrontés à un accident de fabrication visible en surface des fromages (apparition de colorations jaune fluorescent). De surcroît d'autres défauts sont associés à ces colorations : odeurs nauséabondes, saveur amère. Cet accident entraîne de graves préjudices commerciaux. La littérature désigne *Pseudomonas* comme le germe responsable **(LE Mens et al., 2004)**.

Par ailleurs, il a été remarqué l'apparition sur les fromages de chèvre de défauts rouge-marron provoqués par le *Pseudomonas*. Sa présence est accompagnée d'autres défauts : goût piquant ou amertume, croûte poisseuse, visqueuse etc. ce germe est très présent dans l'environnement. On le trouve un peu partout dans l'élevage, le lait et la fromagerie **(Cuvillier, 2006)**.

En 2008 **(Gobin et Surgeres)**, ont signalé que les croûtes de fromages de chèvres lactiques au lait crû sont de plus en plus souvent colorés en jaune fluo au bout de huit à dix jours d'affinage. La couleur caractéristique s'accompagne d'une odeur putride traduisant une protéolyse poussée. Cette odeur et cette couleur traduisent la présence de *Pseudomonas fluorescens*.

Au cours de l'année 2011, il a été signalé en Poitou-Charentes que de nombreux producteurs de fromages ont connu des accidents de croûtes avec des taches roses plus ou moins pâles et souvent réparties de façon irrégulière sur les fromages. Si ces taches roses virent au foncé au cours de l'affinage, et que la croûte devient amère il peut s'agir d'une contamination par *Pseudomonas* dont les pigments ne se limitent pas au jaune fluo. **(Chabanon, 2011)**

Plus récemment, en 2012, la station expérimentale caprine du Pradel a évalué le niveau de contamination de l'eau de réseau alimentant la ferme en *Pseudomonas fluorescens*. **(Morge, 2012)**.

Le but de ce travail, est d'une part, de prouver in vitro (antagonisme direct) l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* à l'égard des *Pseudomonas* contaminant des fromages frais de chèvre ; d'autre part de réduire cette contamination par l'ensemencement préalable des laits avant leur caillage par *Lactobacillus plantarum*. Les fromages fabriqués à partir des laits ainsiensemencés seront conservés dans le lactosérum afin d'essayer de le valoriser.

Synthèse bibliographique

I. les bactéries lactiques :

I.1. Caractéristiques générales :

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XXe siècle, les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène, qui n'est pas clairement défini du point de vue taxonomique. Elles rassemblent en effet un certain nombre de genres qui se caractérisent par la production, liée à un métabolisme exclusivement fermentaire, de quantités importantes d'acide lactique à partir des sucres (**Hadef, 2012**).

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (**Dellaglio et al., 1994 ; Hogg, 2005**).

I.2. Habitat et origine :

Elles ne se développent que dans des milieux riches et sont rencontrées dans des écosystèmes aussi variés que les produits alimentaires fermentés tels que le lait et ses dérivés (beurre, fromage et yaourt), les viandes (saucisses et saucissons), le poisson et ses dérivés, les boissons (vin, cidre et bière), le pain et les produits végétaux (choux, soja et manioc). On les a également retrouvées au niveau des cavités corporelles externes de l'Homme ou de l'animal (**Sharpe, 1981**).

I.3. Classification :

La classification s'appuie maintenant sur des techniques moléculaires comme par exemple le contenu en GC de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence de l'ARN ribosomique (ARN 16S et 23S) ainsi que le profil protéique. (**Reveneau, 2001**).

Les bactéries lactiques regroupent 11 genres dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, et *Pediococcus* (**Stiles et Holzapfel, 1997. Cité par Givry 2006**).

I.4. Caractéristiques des principaux genres à l'étude :

I.4.1. Les Lactocoques :

Schlefer et al. (1985) ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*.

Ce genre (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits « lactique », car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène. Les produits végétaux constituent leur réservoir principal, mais ils sont largement présents dans le lait et les produits laitiers (**Pilet et al., 2005**).

Les lactocoques se présentent sous forme de coques en paire ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que de l'acide lactique, seul *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produit le diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable de se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exopolysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables de se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine (**Tamime, 2002**).

Actuellement, le genre *Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *hordniae* (**Pot et al., 1996 ; Pot, 2008**).

I.4.2 Les Lactobacilles :

Le genre *Lactobacillus* contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (**Khalid et Marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994**).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (**Tamime, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**) :

Groupe I « Thermobacterium » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Synthèse bibliographique

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

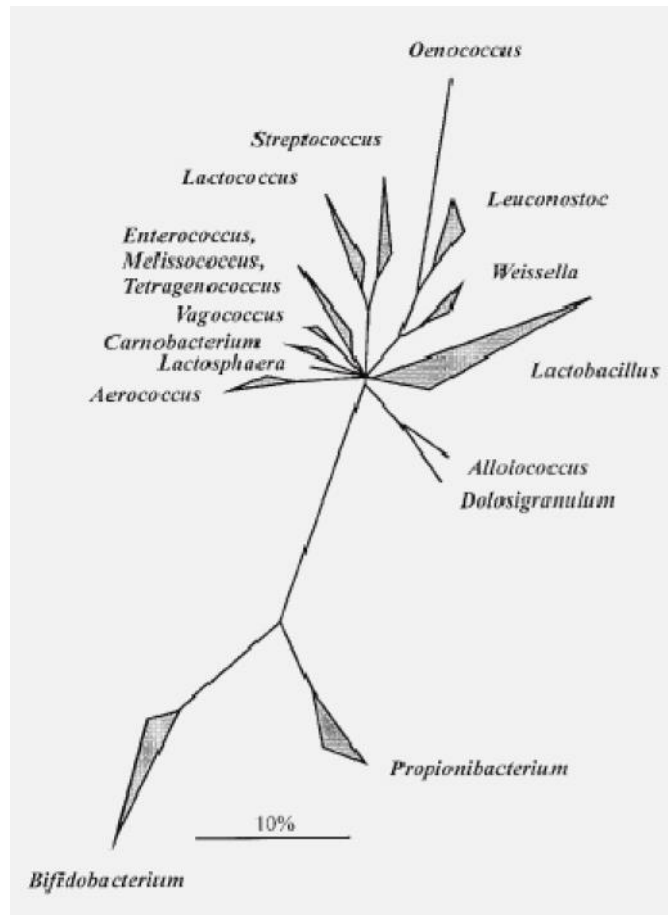


Figure 1 : Arbre phylogénétique, basé sur l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques des bactéries lactiques et les genres non liés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2001).

I.4.2.1. *Lactobacillus plantarum* :

L'espèce *Lactobacillus plantarum* est une bactérie : Gram positif, non pathogène, naturellement existante dans la salive humaine et au niveau du TD. Elle est en forme de bâtonnet (rod-shaped), Hétérofermentaire facultative (fermente les pentoses et/ou le gluconate), Mésophile, à croissance positive à 15°C mais pas à 45°C.

C'est une bactérie ubiquitaire qui peut être rencontrée dans différentes niches écologiques (aliments fermentés et tractus gastro-intestinal) (sirulin, 2010).

Synthèse bibliographique

Aérotolérante, elle peut convertir l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (voie de manganèse dépendante), ce qui lui confère une grande tolérance à l' H_2O_2 .

En l'absence d'oxygène, elle est capable de fermenter les sucres en acide lactique et alcool (hétérofermentaire). L'acide lactique produit est une combinaison de D-et L-isomères. De plus, elle est capable de liquéfier la gélatine. (**anonyme, 2009**)

Selon (**Molin, 2006**), *Lactobacillus plantarum* diffère des autres *Lactobacillus spp* par:

- un génome qui est relativement important 3,3 Mb.
- une capacité à fermenter de nombreux glucides.
- Une exigence au Mn^{2+} comme cofacteur pour la pseudocatalase dans le but d'hydrolyser H_2O_2 .
- Manifeste peu d'auxotrophies : vitamine B5 (indispensable à la formation du coenzyme-A) et vitamine B3 (précurseur du NADH).
- Une résistance aux conditions acides du fait de sa présence dans les aliments fermentés.
- Capable de métaboliser les acides phénoliques.

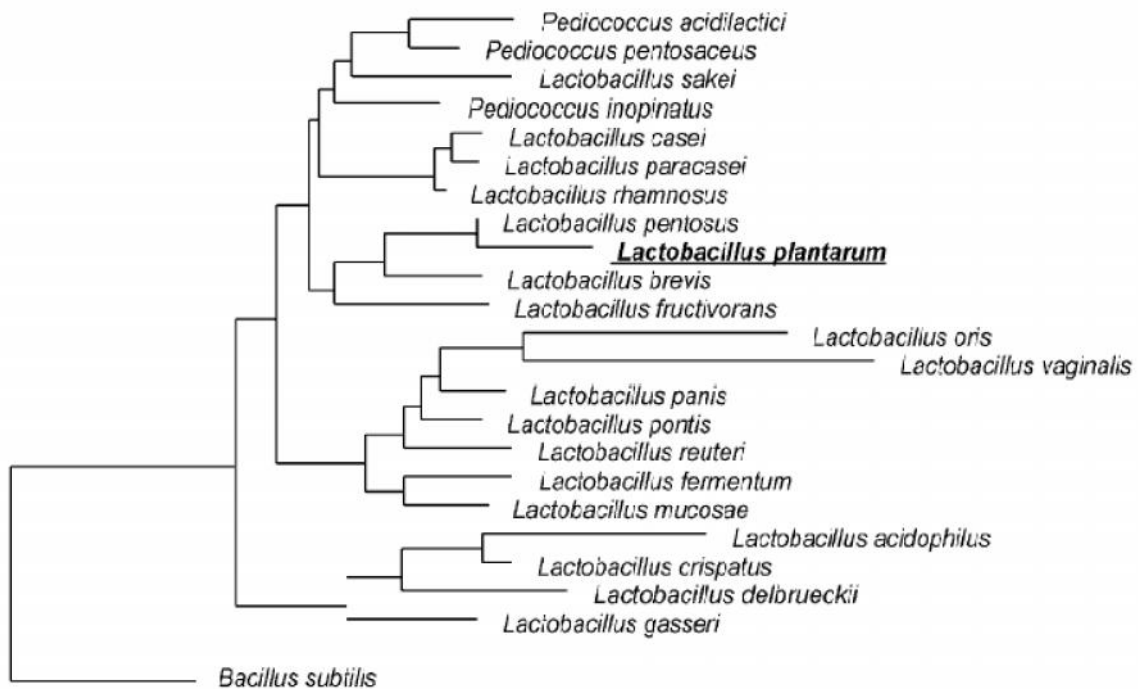


Figure 2: Dendrogramme (ADNr 16S) montrant la relation phylogénétique de *Lb. plantarum* à un ensemble sélectionné de bactéries lactiques représentatives (Maaïke et al., 2005)

I.5. Les différentes bactéries lactiques utilisées en fromagerie :

Elles appartiennent principalement à trois genres : *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* qui se différencient, entre autre, par leur activité acidifiante. Se développant assez difficilement au pH initial du lait, les lactobacilles thermophiles ne sont jamais utilisés seuls en fromagerie (Hassan et Frank, 2001 ; Chamba, 2008).

I.6. Rôles et propriétés des bactéries lactiques en fromagerie :

En fromagerie, l'objectif principal est d'atteindre les valeurs cibles en termes d'extrait sec, la gestion de l'égouttage est étroitement liée à l'acidification du produit au cours de sa fabrication. L'impact fermentaire sur la qualité des produits est donc très important. Les fournisseurs de ferments industriels proposent aujourd'hui des associations de ferments très spécifiques de façon à avoir la cinétique d'acidification souhaitée (Branger et al., 2007).

II. Les pseudomonas

II.1. Généralités :

Ce sont généralement des bactéries psychrotrophes, capables de se développer à 7°C ou moins, indépendamment de leur optimum de croissance. En fait, la température minimum d'activité métabolique des psychrotrophes est proche de -10°C.

Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés, très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose), chimioorganotrophes, présentant une activité catalase, et généralement une activité oxydase, non producteurs d'indol et d'acétoïne et ne se cultivant pas à un pH inférieur à 4,5.

(Ezeby, 2013).

D'après **(Guiraud, 2003)**, il n'existe pas de milieu spécifique utilisable pour l'ensemble des *Pseudomonas*. Ils se multiplient sur les milieux ordinaires.

L'isolement s'effectue sur milieu gélosé contenant un inhibiteur des Gram+. Il existe quelques milieux spécifiques : gélose CFC, gélose au cétrimide, gélose pseudomonas CN (qui contient de l'acide nalidixique), gélose pyocyanosel et la gélose d'isolement pour *Pseudomonas* contenant de l'irgasan.

Les *Pseudomonas* sont largement répandus dans le sol, l'eau et l'environnement. On les retrouve souvent sur la peau des mamelles de vache **(Chatelin et Richard, 1981 ; Desmasures et al., 1997)** et dans les installations de traite **(Chatelin et Richard, 1981 ; Laithier et al., 2004)**.

Ils sont retrouvés très fréquemment dans les laits crus réfrigérés **(Desmasures, 1995 ; Leriche et al., 2004 ; Giannino et al., 2009 ; Ercolini et al., 2009)**.

D'après **(Vignola, 2002)**, les *Pseudomonas* ont une action protéolytique se traduisant par l'amertume, gout de fruit, de vanille ou de malt dans le lait. Par la lipolyse, ils provoquent la rancidité des produits laitiers.

L'espèce la plus répandue dans les laits est *P. fluorescens* **(Richard, 1981)**. Les niveaux de

Synthèse bibliographique

Pseudomonas dans les laits de vache sont variables selon les études. D'après Michel *et al.* (2001), le niveau moyen est de 148 ufc.ml-1 dans les laits prélevés dès la fin de la traite.

Pour **Desmaures *et al.* (1997)**, il peut s'élever à $1,8 \cdot 10^3$ ufc.ml-1 dans les laits réfrigérés.

La production d'enzymes (protéases et lipases) thermostables peut être responsable de défauts de goût, notamment de l'amertume (**Lemieux et Simard, 1991**), ainsi que des défauts de croûtage, ceci dans les technologies à pâte molle, croûtes lavées ou pâtes lactiques.

Par ailleurs certaines espèces, notamment *Pseudomonas fluorescens* produisent des pigments qui sont à l'origine de défauts de coloration de la surface des fromages. (**Chabanon et al, 2010**).

Le lait chargé en *pseudomonas* contamine l'ensemble de la machine à traire et le matériel de fromagerie, ce qui provoque la formation de biofilms (communautés microbiennes immobilisées sur une surface). (**Centre fromager de carmejane, 2004**).

Berdague *et al.* (1990) rapportent, cependant, un intérêt des *Pseudomonas* dans la production d'enzymes participant à l'affinage. **Demarigny *et al.* (1997)** a décrit, dans ce sens, l'action bénéfique de ces bactéries sur la présure, favorisant ainsi le métabolisme des bactéries lactiques.

II.2. Habitat :

Les *Pseudomonas* se rencontrent dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines. La plupart des souches se développent à basse température (souches psychrophiles), contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur.

Ils représentent avec les entérobactéries et les coliformes la flore minoritaire des trayons des chèvres (**PEP caprin, 2011**) néanmoins, ils représentent 10 à 75% de la flore totale des laits selon l'hygiène de la traite. (**Morge, 2011**).

II.3. Taxonomie :

La classification actuelle des *Pseudomonas* et des divers bacilles à Gram négatif non fermentants voisins est la suivante (Eyquem et al, 2000) :

Groupe I d'ARN :

Genre *Pseudomonas* stricto sensu :

- *P. aeruginosa*
- *P. fluorescens*
- *P. putidia*
- *P. veronii sp nov*
- *P. alcaligenes*
- *P. pseudoalcaligenes*
- *P. mendocina*
- *P. stutzeri*
- *P. balearica sip nov*
- *P. monteilii sp nov*

Groupe II d'ARN :

Genre *Bulkholderia* (1992) :

- B. mallei*
- B. pseudomallei*
- B. cepacia*
- B. vietnamiensis*

Genre *Ralstonia* (1995)

- R. pickettii*
- R. solanacarrum*

Groupe III d'ARN : famille des comamonadaceae (1991)

Genre *comamonas*

- C. testosteroni*
- C. acidovorans*
- C. terrigena*

Genre *acidovorax*

- A. delafieldii*
- A. temperans*
- A. facilis*

Et les genres *Hydrogenophaga*, *Xylophilus*, *Variovorax*

Groupe IV d'ARN :

Genre *Brevundimonas* (1994)

-*B. diminuta*

-*B. visicularis*

Groupe V d'ARN :

Genre *stenotrophomonas* (1993)

-*S. malotophilia*

-*S. africana sp nov*

II.4.Résistance aux antibiotiques :

Les espèces du genre *Pseudomonas* présentent une résistance acquise aux antibiotiques ce qui rend nécessaire le recours à un antibiogramme. D'une manière générale on peut noter les points suivants :

- La sensibilité aux bêta-lactamines est très variable selon les espèces et les souches.
- La grande majorité des souches est sensible aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux acyluréidopénicillines.
- L'utilisation d'un inhibiteur des bêta-lactamases en association avec l'amoxicilline est généralement bénéfique.
- Les céphalosporines de première et de deuxième génération sont souvent inactives alors que les céphalosporines de troisième génération ont une efficacité notable.
- Les aminosides sont généralement actifs.

(Ezeby,2005).

III. Lait, fromage et lactosérum

III.1. Le lait de chèvre :

Le lait de chèvre est un liquide blanc ou mât, opaque d'une saveur peu sucrée dont l'odeur (chèvre) lorsqu'il est récolté et conservé proprement, est peu marquée voir inexistante. Il donne une impression bien homogène c'est-à-dire ni trop fluide ni trop épais.

Du point de vue de ces qualités nutritives et digestives, le lait de chèvre possède une valeur de premier ordre. Il est moins allergène et subit plus lentement la fermentation lactique que celui de la vache. Ces qualités diététiques sont la conséquence d'un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques. (**Laba, 2004**)

D'après (**Zaller, 2005**), un bon lait de fromagerie doit:

- être riche et équilibré en constituants fromagers (caséine, matière grasse...)
- posséder un bon équilibre minéral (calcium, phosphore)
- renfermer une flore microbienne limitée principalement constituée de germes utiles pour la fabrication (bactéries lactiques acidifiantes) avec le moins possible de germes responsables d'altérations (coliformes, butyriques, ...) et exempte de germes pathogènes
- ne pas contenir de substances indésirables (inhibiteurs et autres contaminants chimiques)

En revanche, les laits anormaux à la production du fromage sont : le colostrum, le lait de fin de lactation (dérèglement physiologique), le lait de rétention, les laits pathologiques (lait de mammites), les laits contenant des antiseptiques et/ou des antibiotiques, les laits colorés, malpropres ou malodorants.

Le lait de chèvre est particulièrement pauvre en vitamine A, ce qui lui donne une coloration plus blanche que les autres laits. Par ailleurs, l'eau représente 90% du lait mais il existe quelques variations quant à la teneur en matière sèche : le lait de chèvre en contient environ 136 grammes par kilogramme (g/kg) de lait alors que celui de la vache n'en contient que 125. (**Zaller, 2005**) (tableau I).

Synthèse bibliographique

Tableau I : composition du lait de chèvre (Anonyme, 2013).

Constituants	Quantité (g/l)
Eau	890-910
Extrait sec total	116-134
Matière grasse	28-42
Lactose	44-47
Matière azotée	
Caséines	18-26
autre	8-10
Constituants divers	Enzymes, vitamines, microorganismes

III.2. Le fromage de chèvre :

Les fromages frais sont traditionnellement des fromages à égouttage lent, fabriqués à partir de laits ou de crèmes propres à la consommation humaine. Ils résultent de la coagulation à prédominance lactique du lait, combinant souvent l'action des ferments lactiques à celle de la présure. Ces fromages se caractérisent par l'absence d'affinage après les étapes d'égouttage et de moulage. Tous les fromages frais ont une DLC (date limite de consommation) de 24 jours (Mahaut *et al.*, 2000 ; Luquet et Corrieu, 2005).

Le fromage frais commercialisé est fabriqué soit à partir de lait de vache ou de lait de chèvre. Le processus général de fabrication se résume en trois grandes étapes essentielles : la maturation, la coagulation et l'égouttage (Randazzo *et al.*, 2002).

La technologie lactique représente 85 % de la production de la filière fromagère caprine. La coagulation du lait y est obtenue par une action prédominante des ferments lactiques, ce qui conduit à une cinétique de coagulation/acidification lente, d'une durée comprise entre 16 et 24 h, avec un pH en début d'égouttage proche de 4,40. La vitesse et le niveau de l'acidification doivent être maîtrisés pour l'obtention d'un produit possédant des qualités sensorielles et microbiologiques satisfaisantes, mais aussi pour éviter des dysfonctionnements de l'atelier et des pertes de productivité (par exemple immobilisation de matériel lié à des retards d'acidification). Cependant, le contrôle de l'acidification peut être difficile à réaliser pour des raisons liées à l'activité des ferments, mais aussi à la nature de la matière première. (Morgan et Masle, 2000).

III.2.1. La technologie lactique

Dans le cas de la coagulation lactique, la déstabilisation proprement dite est initiée par l'ajout de présure, mais à une dose insuffisante pour l'obtention d'un coagulum ferme. C'est l'acidification du caillé qui permet la neutralisation des micelles de caséine, l'augmentation de la fermeté du gel et l'égouttage du caillé. Cette technologie est utilisée majoritairement pour les fromages de chèvre fermiers et les fromages de chèvre sous AOP (Rocamadour, Pélardon, Picodon, Selles-sur-Cher, Ste Maure de Touraine, Crottin de Chavignol, etc ...). (Tormo, 2010).

III.2.2. Etapes de fabrication du fromage :

D'après (Saurais, 1973), la fabrication d'un fromage comprend trois phases essentielles :

- 1) Formation du gel de caséine - coagulation;
- 2) Déshydratation partielle de ce gel par synérèse, c'est-à-dire par contraction des micelles qui le forment. Egouttage du caillé;
- 3) Maturation enzymatique du gel déshydraté. La pasteurisation ayant détruit une partie de la flore lactique, on réensemence le lait avec un levain.

Puis on emprésure par addition de présure à 1/5000 l.

III.2.2.1. La coagulation (caillage) :

La coagulation du lait peut se faire selon deux voies : acide ou mixte. La coagulation par voie acide consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique par acidification bactérienne (ferments lactiques) qui aboutit à la déstructuration des micelles de caséines avec une réorganisation de ces protéines en gel. La coagulation enzymatique présente la même finalité puisqu'elle consiste en la transformation du lait en gel par l'action d'enzymes protéolytiques qui vont préférentiellement hydrolyser les caséines k, désorganisant ainsi les micelles et permettant ensuite leur réticulation. La coagulation mixte résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. Selon la méthode utilisée, le gel présente des propriétés différentes, par exemple lorsqu'il est obtenu par coagulation acide il est très friable et peu élastique, il résistera donc moins bien aux traitements mécaniques que le gel issu d'une coagulation enzymatique (Raynaud *et al.*, 2003 ; Jeantet *et al.*, 2006).

III.2.2.2. L'égouttage :

Lors de cette étape, la plus grande partie des éléments solubles sont éliminés dans le lactosérum. On peut considérer qu'il s'agit d'une déshydratation partielle du caillé. Cette phase consiste en l'élimination plus ou moins grande de lactosérum emprisonné les mailles du gel formé par voie acide et/ou enzymatique. Elle commence dans les cuves de coagulation,

puis se poursuit dans les moules et enfin en hâloirs. L'égouttage spontané d'un gel lactique est lent et limité, il conduit à un caillé hétérogène. Des procédés tels que la centrifugation et l'ultrafiltration du caillé permettent d'accélérer notablement l'égouttage, en comparaison des procédés traditionnels (égouttage en faisselle, en sac ou en filtre berge). Cependant, un gel présure est un gel compact, solide ou l'égouttage ne peut avoir lieu qu'après certaines interventions telles des actions mécaniques de pression (**St-Gelais et al., 2002 ; Jeantet et al., 2006**).

Suivant le goût du fromager, le salage peut être fait. Il est permis d'ajouter aux fromages frais des substances variées (dans une proportion ne dépassant pas les 30% du poids du produit fini) : le sucre (saccharose), les matières aromatiques naturelles, fruits, pulpes et jus de fruits, confitures, miel et colorants (**Randazzo et al., 2002**).

III.2.3. Rendement fromager :

Le rendement en fromage est le rapport entre la quantité de fromage obtenue et la quantité de lait utilisé (g/L ou Kg/100L) (**St-Gelais et al., 2002**)

III.3. Le lactosérum :

Le lactosérum est le liquide jaune pâle qui reste après la coagulation de lait lors de la fabrication du fromagère ou de la caséine ; où l'on retrouve la majeure partie de l'eau avec toutes les substances du lait (**Kosikowski, 1979**).

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie.

III.3.1. Différents types de lactosérum :

Selon l'acidité Dornic ($1^{\circ}D = 0,1$ g d'acide lactique par litre de produit) inférieure ou supérieure à 1.8 g d'acide lactique par litre on peut distinguer deux types de sérum, (**Veisseyere, 1975**) :

- **Le lactosérum doux** : pH environ de 6,5 à 6,7 (l'acidité est inférieure à $18^{\circ}D$), issu de la fabrication de fromage à pâte pressée ou à pâte cuite.
- **Le lactosérum acide** : pH environ de 4,5 à 5 (l'acidité est supérieure à $18^{\circ}D$), provient des caséineries ou des fromageries fabriquant des pâtes fraîches ou des pâtes molles.

III.3.2. Composition chimique du lactosérum :

La composition chimique du lactosérum varie considérablement selon la source du lait, les différents traitements que l'on fait subir pour le transformer en produits consommables (**Laplanche, 2004**).

Synthèse bibliographique

Les protéines de lactosérum représentent environ 20% de la totalité des protéines laitières et sont principalement constituées de P-lactoglobuline (**56-60%**), d'a-lactalbumine (18-24%), d'immunoglobuline (6-12%) *et* de sérum-albumine (**6.12%**). De plus, elles contiennent de la lactoferrine, du lysozyme et des fragments de B-caséine, anciennement connus sous le nom de protéose-peptone (**Lemay, 2000**) (tableau II).

Tableau II : Composition chimique du lactosérum (**Alais, 1981**)

Paramètres	Lactosérum doux (g/l)	Lactosérum acide (g/l)
Acidité	13.83°D	67.16°D
Humidité	93.5%	93%
Matières sèches	55-75	55-65
Cendres	4-6	6-8
Lactose	40-57	40-50
Matière azoté totale	7-11	4.8-10.5
Matière grasse	0-5	0-2
Acide lactique	0-0.3	7-8
Chlorure	2.3-2.9	2.0-2.2
Calcium	0.4-0.6	1.2-1.4
Phosphore	0.4-0.7	0.5-0.8
Potassium	1.4-1.6	1.2-1.5

III.3.3. Intérêt industriel du lactosérum :

Représentant 80% du lait, le lactosérum est un produit encombrant pour les industries laitières. Cependant, des recherches récentes ont mis en évidence sa valeur nutritive et ses applications dans différents domaines : alimentaire, médicale et biotechnologique. (**Alais, 1975**)

En effet, le lactosérum est utilisé dans l'alimentation animale, les régimes pauvre en protéines, la diététique, les régimes des sportifs et des personnes âgées (**Dryer, 2001**).

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail :

Le but de ce travail, effectué au niveau du laboratoire de microbiologie appliquée (laboratoire de microbiologie du lait et des probiotiques, Université A/Mira de Bejaia) consiste d'une part, de prouver *in vitro* (antagonisme direct) l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* à l'égard des *Pseudomonas spp* contaminant des fromages frais de chèvre ; d'autre part de réduire cette contamination des fromages par conservation dans le lactosérum.

L'utilisation du lactosérum pour la conservation des fromages aura des conséquences économiques et écologiques :

Incidences économiques :

- ✓ Valorisation d'un sous produit destiné initialement dans notre pays à être évacué en masse et le plus souvent sans traitement dans le réseau des eaux usées.
- ✓ Création d'emplois
- ✓ Création d'activités induites par cette valorisation (fabrication de la poudre de lactosérum)

Incidences écologiques :

- ✓ Récupération d'un déchet encombrant pour les fromageries et diminution de la pollution.

2. Matériel biologique :

2.1. Bactéries lactiques :

Les souches utilisées pour ce travail (*Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*) appartiennent à la collection de souches du Laboratoire Microbiologie Appliquée (Laboratoire de Microbiologie Appliqué et des Probiotiques) de l'université A. /Mira de Bejaia.

La souche *Lactobacillus plantarum* est isolée à partir des olives (après cueillette).

2.2. Bactéries pathogènes :

Les souches des *Pseudomonas spp* sont d'origine alimentaire et récupérées au niveau des laboratoires d'analyses et contrôle de qualité de la wilaya de Bejaia.

3. Standardisation des inocula :

- 1) Standardisation de l'inoculum de *Lactobacillus plantarum*
 - A partir d'un tube contenant le bouillon MRS et *Lactobacillus plantarum* on prélève 1ml de ce bouillon et on l'ensemence dans un tube contenant du bouillon MRS et on incube à 30°C pendant 24 à 48 heures.
 - Après croissance, un prélèvement est réalisé à l'aide d'une anse de platine. un ensemencement par stries sur boîte de Pétri contenant de la gélose MRS est effectué. Cette dernière est incubée à 30°C pendant 24 à 48heures.
 - Trois colonies de *Pseudomonas spp* sont ensemencées dans 9ml de bouillon MRS puis on incube à 30°C pendant 18 à 24heures.
 - Procéder ensuite à la préparation des dilutions (10^{-1} 10^{-10}) puis ensemencer deux boites pour chaque dilution.
 - Après incubation à 30°C pendant 18 à 24 heures, on procède au dénombrement des colonies (Figure 03).

- 2) Standardisation de l'inoculum des *Pseudomonas spp*
 - A partir d'un tube contenant le bouillon (BHI) et *Pseudomonas spp* on prélève 1ml de ce bouillon et on l'ensemence dans un tube neuf contenant du bouillon (BHI) et on incube à 37°C pendant 24 à 48 heures.
 - Après croissance, un prélèvement est réalisé à l'aide d'une anse de platine. un ensemencement par stries sur boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive ordinaire est effectué. Cette dernière est incubée à 37°C pendant 24 à 48heures
 - Trois colonies de *Pseudomonas spp* sont ensemencées dans 9ml de bouillon (BHI) puis on incube à 37°C pendant 18 à 24heures.
 - Procéder ensuite à la préparation des dilutions (10^{-1} 10^{-10}) puis ensemencer deux boites pour chaque dilution.
 - Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, on procède au dénombrement des colonies (Figure 04).

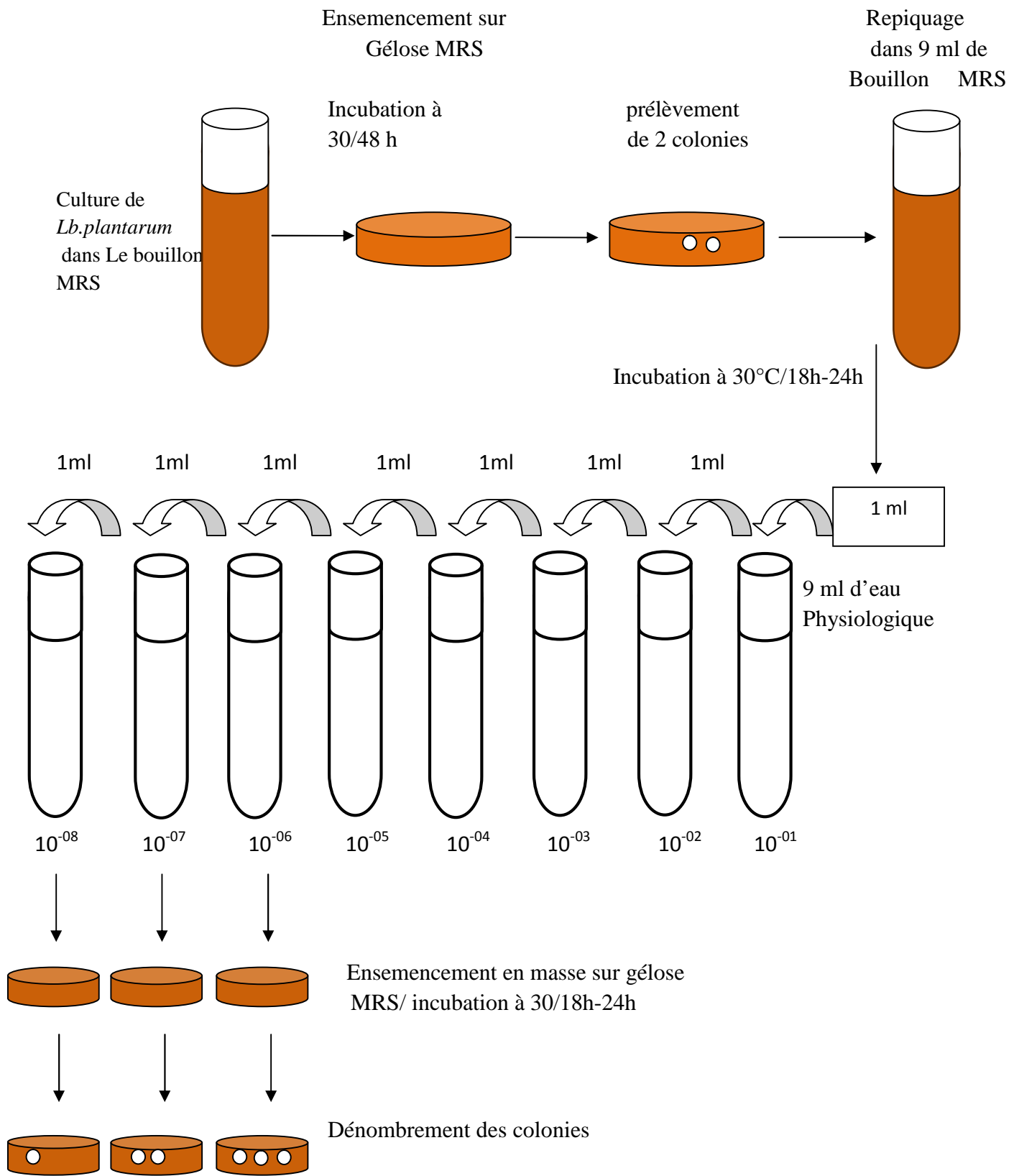


Figure 03 : Standardisation de l'inoculum de *Lactobacillus Plantarum*

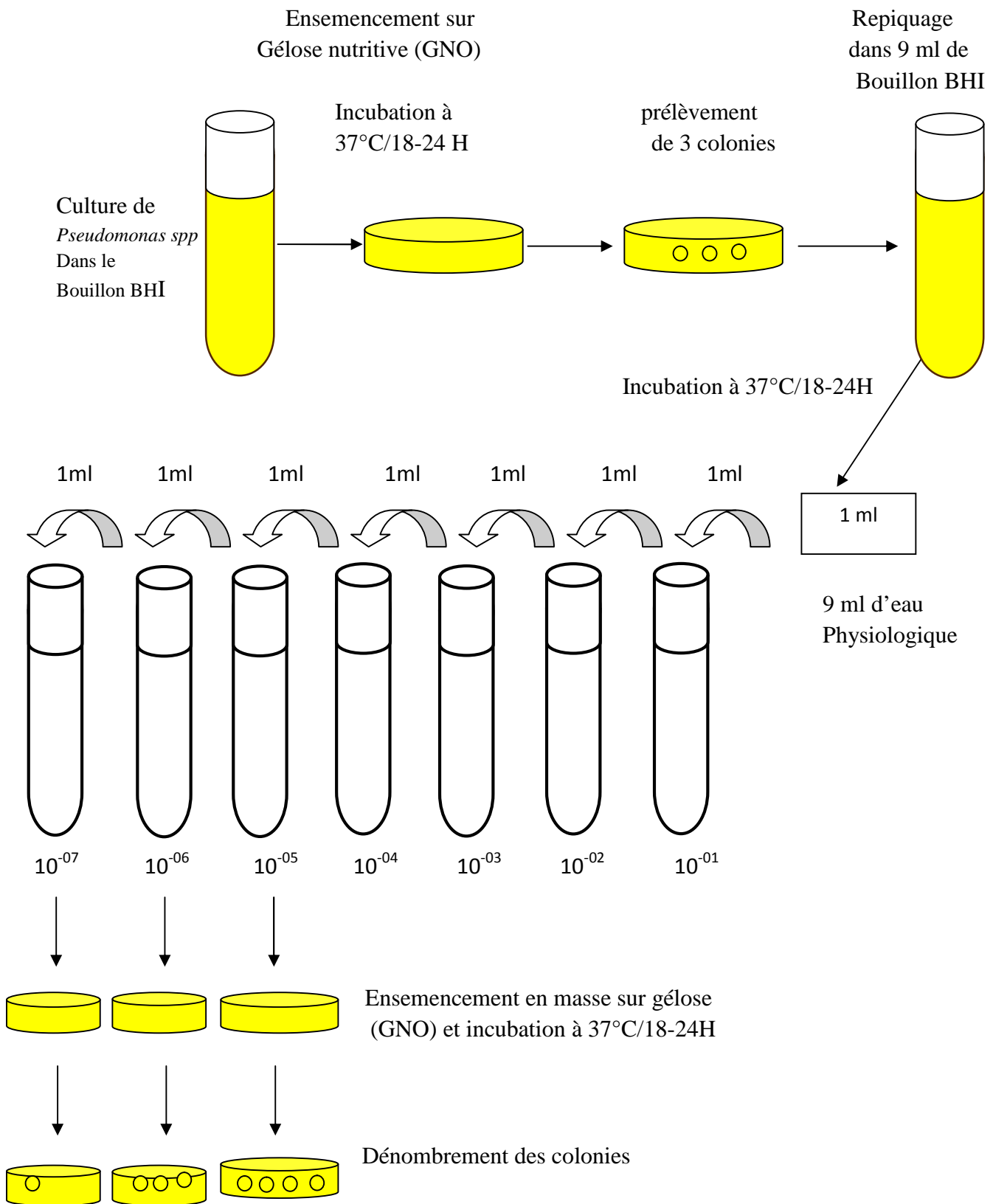


Figure 04 : Standardisation de l'inoculum des *Pseudomonas* spp

4. Criblage des bactéries lactiques :

4.1. Réalisation du test des spots :

Pour la réalisation du test des spots on a suivi le protocole suivant :

1) Repiquage des bactéries lactiques :

A partir des boîtes de pétri, on prend une colonie avec l'anse de platine et on la met dans 05 ml de bouillon MRS, puis on incube les tubes à 30°C pendant 18 à 24 heures.

NB : Faire un tube témoins pour le bouillon MRS.

Remarquer apparition d'un trouble après incubation.

➤ Ensemencement sur boîtes de Pétri :

A partir de ces tubes, on prélève une goutte avec l'anse de platine, puis on l'ensemence par stries sur gélose MRS. Les boîtes seront ensuite incubées à 30°C pendant 24 heures. il y aura apparition de colonies lisses.

NB : les bouillons repiqués seront conservés à 4°C

➤ Repiquage à partir des boîtes de Pétri:

A partir de ces boîtes de pétri, on prend deux colonies de *Lactoacillus plantarum* et quatre colonies de *Lactococcus lactis* et on les met dans 9ml de bouillon MRS, puis on incube à 30°C pendant 24 heures.

2) Repiquage de la souche pathogène (*Pseudomonas spp*):

Dans 9ml de bouillon BHI, on ensemence une goutte des *Pseudomonas spp* en tube précédemment utilisés, puis on incube à 37°C pendant 24 heures ; il y aura apparition d'un trouble.

On effectue ensuite l'ensemencement d'une goutte avec l'anse de platine sur boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive ordinaire (G.N), et on incube à 37°C pendant 24 heures.

NB : après incubation des boîtes, il y aura apparition de colonies blanchâtres.

3) Réalisation du test des spots :

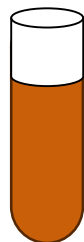
A l'aide d'une micropipette, on prélève deux fois 5µl de bactéries lactiques (tube MRS repiqués) et on les dispose sur une boîte de pétri contenant la gélose MRS de façon à obtenir deux spots bien ronds, de même taille et identiques. On laisse sécher longuement devant le bec bunsen (1 heure), puis on incube délicatement à 30°C pendant 24 heures.

NB : les souches pathogènes doivent être repiquées le même jour afin qu'on puisse finaliser le test des spots 24 heures après.

A partir des souches fraîches du pathogène (*Pseudomonas spp*) on prépare la dilution (10^{-1}). On prend ensuite 1ml de cette dilution et on le met dans un tube contenant 9ml de gélose en surfusion. Après avoir vortexé pour homogénéiser, on verse le tout dans la boîte contenant les spots et on incube à la température du pathogène (37°C). (Figure 05)

Souche teste (*Lb. plantarum*)

Repiquage des
Souches sur bouillon
MRS



Incubation 30°C/24 H

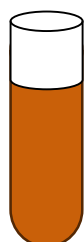
Ensemencement
Sur gélose MRS



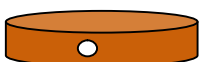
Incubation à
30°C/48H



Prélèvement de 2
Colonies dans 9ml
De bouillon MRS et
Incubé 30°C/18h



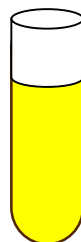
Déposer 5 µl de la
suspension
en spot



incubation 30°C/18H

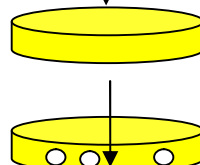
Souches cibles (*Pseudomonas spp*)

Repiquage des
Souches sur bouillon BHI



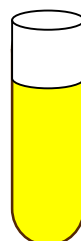
Incubation 37°C/24 H

Ensemencement
Sur gélose chapman



Incubation à
37°C/42H

Prélèvement de 3
Colonies dans 9ml
De bouillon BHI et
Incubé 37°C/18h



Prendre 1ml de la
suspension
+
9ml de la gélose nutritive
En surfusion

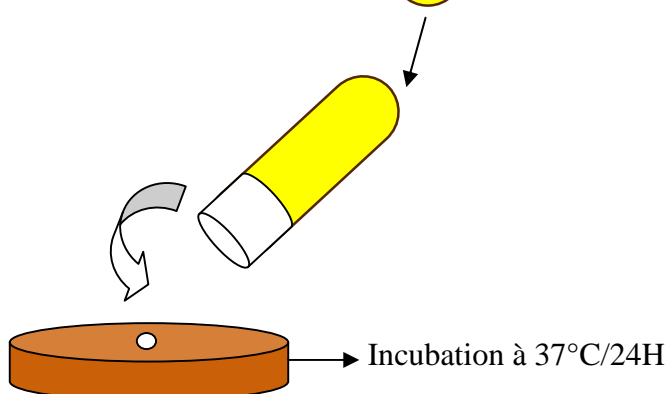
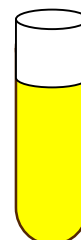


Figure 05 : Schéma illustrant les étapes suivies pour le test des spots

5. Réalisation de la cinétique de croissance et évolution du pH et de l'acidité Dornic des *Pseudomonas spp* dans le lait et le lactosérum stérile :

Pour réaliser la cinétique de croissance de *Pseudomonas spp* nous avons procédé aux étapes suivantes :

- D'abord, on effectue un repiquage de *Pseudomonas spp* sur deux boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive ordinaire puis on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Ensuite on stérilise le lait et le lactosérum
 - ✓ Après filtration du lait, on le verse dans des flacons de 200ml puis on plonge ces flacons au bain-marie pendant 10 minutes à 100°C.
 - ✓ Pour le lactosérum la stérilisation s'effectue à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.
- Réalisation des cinétiques de croissances, de pH et d'acidité Dornic :

Après inoculation du lait et du lactosérum (200ml pour chacun) on effectue un prélèvement de 10ml de chaque flacon pour réaliser les mesures du pH et de l'acidité Dornic. Un deuxième prélèvement est effectué pour la réalisation de l'ensemencement des boîtes de Pétri (10^0) et la préparation des dilutions ; cette opération est répétée toutes les deux heures (T0,T2,T4,T6) et après 24h

 - ✓ Mesure du pH

Après avoir étalonné le pH-mètre (HANNA pH 211), on rince la sonde à l'eau distillée puis on l'essuie avec du papier absorbant. Ensuite on verse les 10ml de lait dans un bécher et on plonge la sonde du pH-mètre dans le lait et on lit le résultat sur l'afficheur.
 - ✓ Mesure de l'acidité Dornic :

Dans le même bécher et avec le même échantillon, on verse deux gouttes de phénolphthaléine (1%) puis à l'aide d'une burette de Mohr on procède à la titration avec NaOH à 1/9 N.

Le résultat est calculé comme suit : Résultat= Cb X10Xf (Guiraud, 2003)

Cb : chute de burette
F : facteur de correction
 - ✓ Mesure de la croissance bactérienne :

- Réalisation des dilutions

Avec une micropipette de 1 ml, on prend 1ml de lait et on le met dans 9ml d'eau physiologique, on vortexe le tube puis on prélève cette fois à partir du tube 10^{-1} 1 ml et on le plonge dans 9ml d'eau physiologique pour avoir la dilution 10^{-2} et ainsi de suite pour passer aux dilutions suivantes.

- Ensemencement des boîtes

Deux boîtes sont ensemencées pour chaque dilution et on commence à partir de la dilution 10^0 jusqu'à 10^{-4} pour le T0 et on décale à chaque fois d'une dilution tout en gardant le nombre initial de dilutions (5 dilutions/temps).

On prend deux lots de 5 boîtes de pétri et dans lesquelles on verse 1 ml de chaque dilution. Les boîtes sont ensuite coulées avec de la gélose nutritive ordinaire(GNO) en surfusion, et on fait des mouvements en huit pour une bonne homogénéisation. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24heures. Ensuite on procède au comptage des colonies grâce au compteur de colonies.

NB : La cinétique de croissance, l'évolution du pH et de l'acidité Dornic de *Lactobacillus plantarum* sont mesurées de la même manière que celle de *Pseudomonas spp* sauf que pour la croissance on utilise le milieu MRS gélosé et on incube à 30°C pendant 24heures.

6. Réalisation des antibiogrammes

Pour la réalisation de l'antibiogramme on procède de la façon suivante :

- A partir d'une boîte de Pétri contenant des *Pseudomonas spp* on prélève deux colonies qu'on plonge dans le bouillon (BN) et on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Afin de diminuer la charge microbienne, on réalise une suspension bactérienne (ensemencer 1ml de bouillon contenant les *Pseudomonas spp* dans 9ml d'eau physiologique).
- On prend 5 boîtes de pétri dans lesquelles on coule la gélose mueller-hinton (MH) ; deux serviront comme témoin ; l'une contenant uniquement le milieu de culture utilisé et l'autre est ensemencée par écouvillonnage de la suspension contenant les *Pseudomonas spp*.
- Après ensemencement par écouvillonnage des trois boîtes restantes, on dépose stérilement devant le bec bunsen les disques d'antibiotiques.
- Nous avons utilisé les antibiotiques ci-après :
 - Boîte 1 : Ampicilline et céphalosporine
 - Boîte 2 : Spiramycine et céphotoxine
 - Boîte 3 : vancomycine et oxacilline
- Après 24 heures d'incubation à 37 °C, on vérifie la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des disques.
- Seules les zones d'inhibition ayant un diamètre supérieur à 10mm seront considérées comme positives (résistance de la souche bactérienne testée).

NB : pour la réalisation de l'antibiogramme de *Lactobacillus plantarum* on procède de la même manière mais l'incubation se fera à 30°C au lieu de 37°C et sur gélose MRS.

7. Essai de fabrication d'un fromage frais de chèvre et réalisation de l'expérience visant à éradiquer les *Pseudomonas spp* dans ce fromage :

1) Analyse du lait cru

a- Analyses physicochimiques :

Après récupération du lait cru de chèvre, on mesure le pH et l'acidité Dornic (Rhiat et al., 2011).

b- Analyses microbiologiques :

On a procédé à la recherche et au dénombrement des germes suivants dans le lait cru de chèvre (Rhiat et al., 2011) :

➤ *Flore lactique* :

Pour le dénombrement de la flore lactique, on a utilisé le milieu (MRS) dans lequel on ensemence en masse de la dilution 10^{-4} à la dilution 10^{-8} deux boîtes pétri par dilution et on les incube à 30°C pendant 24 heures. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonies.

➤ *Flore mésophile aérobie totale* :

Dans le milieu (GN), on ensemence et on incube comme précédemment.

➤ *Coliformes totaux* :

On utilise le milieu (VRBG) dans lequel on ensemence en masse de la dilution 10^0 à la dilution 10^{-4} deux boîtes pétri par dilution et on les incube à 37°C pendant 24 heures. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonies.

➤ *Coliformes fécaux* :

On utilise le milieu (EMB) dans lequel on ensemence en masse de la dilution 10^0 à la dilution 10^{-4} deux boîtes de pétri par dilution et on les incube à 44°C pendant 24 heures. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonies.

➤ *Staphylococcus aureus* :

On effectue d'abord un test présomptif qui consiste à mettre 1ml de lait dans 9ml de milieu (GC) auquel on ajoute une goutte d'huile de vaseline avant d'incuber à 37°C pendant 24 heures.

Si le test s'avère positif (noircissement du tube), on recherche les *Staphylococcus aureus* comme suit :

On utilise le milieu de (Chapman) dans lequel on ensemence en masse de la dilution 10^0 à la dilution 10^{-4} deux boîtes de Pétri par dilution et on les incube à 37°C pendant 24 heures. Le dénombrement s'effectue à l'aide du compteur de colonies.

2) fabrication des fromages :

On a fabriqué les fromages ci-après :

➤ ***fromage à partir du lait cru de chèvre + *Lactobacillus plantarum* :***

Dans un bocal contenant 300ml de lait cru de chèvre on ajoute 4.5 ml du ferment *Lb. plantarum* (10^8 UFC/ml) et on incube à 30°C pendant une nuit (12 heures). On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C .

➤ ***fromage à partir du lait cru de chèvre + *Lactobacillus plantarum* + présure :***

Dans un bocal contenant 300ml de lait cru de chèvre on ajoute 4.5 ml du ferment *Lb. plantarum* (10^8 UFC/ml) et on incube à 30°C . On ajoute 20 μl de présure (de marque CAGLIFICIO CLERECI) à pH adéquat (pH 5.5). On réincube ensuite à 30°C jusqu'à formation de deux phases (caillé + lactosérum). Cette opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C .

➤ ***fromage à partir du lait cru de chèvre + présure :***

On incube à 30°C un bocal contenant 300ml de lait cru de chèvre pendant 4 heures. On ajoute ensuite 20 μl de présure (de marque CAGLIFICIO CLERECI) à pH adéquat (pH 5.5). On réincube après à 30°C jusqu'à formation de deux phases (caillé + lactosérum). Cette opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C .

➤ ***fromage à partir du lait stérile de chèvre + *Lactobacillus plantarum* + présure :***

On stérilise 300 ml de lait cru de chèvre au bain marie (100°C pendant 10 minutes) auquel on ajoute une première fois stérilement 4.5 ml du ferment *Lb. plantarum* (10^8 UFC/ml). après incubation à 30°C durant environ 4 heures. Lorsque le pH d' emprésurage est atteint, on rajoute 20 μl de

présure (de marque CAGLIFICIO CLERECI) et on réincube pendant 12 heures environ à 30°C jusqu'à formation de deux phases (caillé +lactosérum). Cette dernière opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C.

➤ ***fromage à partir du lait stérile de chèvre + présure :***

On stérilise 300 ml de lait cru de chèvre au bain marie (100 °C pendant 10 minutes) et on incube à 30°C. Lorsque le pH d'emprésurage est atteint, on rajoute 20 µl de présure (de marque CAGLIFICIO CLERECI) et on réincube ensuite à 30°C pendant 12 heures environ jusqu'à formation de deux phases (caillé + lactosérum). Cette opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C.

➤ ***fromage à partir du lait stérile de chèvre + *Lactobacillus plantarum* :***

On stérilise 300 ml de lait cru de chèvre au bain marie (100 °C pendant 10 minutes) auquel on ajoute 4.5 ml du ferment *Lb plantarum* (10^8 UFC/ml) et on incube à 30°C pendant 12 heures environ jusqu'à formation de deux phases (caillé +lactosérum). Cette opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C.

➤ ***fromage à partir du lait stérile de chèvre + *Pseudomonas spp* :***

On stérilise 300 ml de lait cru de chèvre au bain marie (100 °C pendant 10 minutes) auquel on ajoute 10 colonies fraîches de *Pseudomonas spp* et on incube à 30°C pendant 12 heures environ jusqu'à formation de deux phases (caillé +lactosérum). Cette opération ne doit pas dépasser deux heures. On procède ensuite à l'égouttage dans des faisselles que l'on met par la suite à 4°C.

NB : les lactosérums sont récupérés et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes avant de les utilisés pour la conservation des fromages.

3) Expérience sur les fromages retenus :

Trois fromages ont été retenus :

- ✓ *fromage à partir du lait cru de chèvre + Lactobacillus plantarum*
- ✓ *fromage à partir du lait cru de chèvre + Lactobacillus plantarum + présure*
- ✓ *fromage à partir du lait stérile de chèvre + Lactobacillus plantarum + présure*

Dans les cœurs des fromages ci-avant retenus, on injecte à l'aide d'une seringue 1.66×10^6 UFC/ml de *Pseudomonas spp.* On mesure les pH et les poids de ces fromages qu'on place au frigo à une température de 4 °C.

Au 7^{ème} jour, chaque fromage est découpé en deux portions dont une sera immergée dans le lactosérum et l'autre sera laissée comme telle en barquette et servira de témoin. Les trois paramètres (pH, poids et croissance de *Pseudomonas spp.*) sont mesurés dans les deux portions au 7^{ème} et au 14^{ème} jour.

NB :

- La croissance des *pseudomonas spp.* s'effectue de la façon suivante :
On prélève 1g de fromage avec lequel on prépare les dilutions (10^{-1} à 10^{-6}). On prend deux lots de 6 boîtes de pétri et dans lesquelles on verse 1cc de chaque dilution. Les boîtes sont ensuite coulées avec de la gélose nutritive ordinaire (GNO) en surfusion (45°C) et on fait des mouvements en huit pour une bonne homogénéisation. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.
- La mesure du pH est effectuée à l'aide du pH-mètre de marque (HANNA pH 211).
- Les poids des fromages sont effectués à l'aide d'une balance de marque (Sartorius portable) après tarage à vide des barquettes.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Criblage des souches de bactéries lactiques (test des spots) :



Figure 06: Résultat du test des spots de *Lb. plantarum*

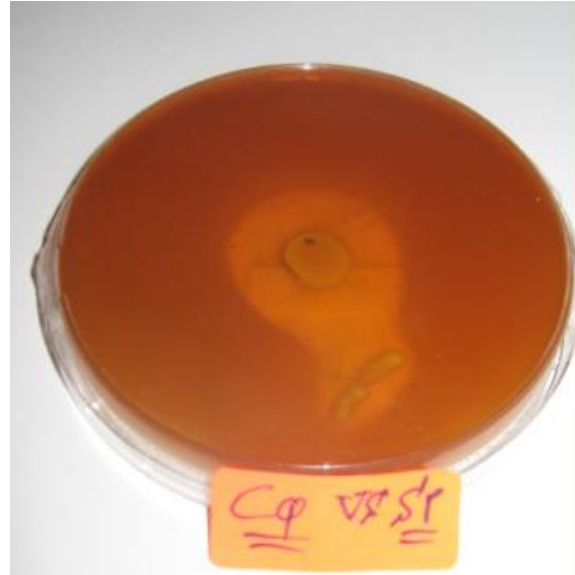


Figure 07: Résultat du test des spots de *Lactococcus lactis*

Les deux figures 06 et 07 montrent une bonne activité antibactérienne des souches test et *Lactobacillus plantarum* a montré un diamètre de zone d'inhibition de 24mm de diamètre largement supérieur à celui de *Lactococcus lactis* (19 mm). Cela indique que *Lactobacillus plantarum* est capable de synthétiser plus de substances antibactériennes que *Lactococcus lactis* à l'égard des *Pseudomonas spp.*

D'après l'étude menée par (Mami et al., 2010) sur l'activité antibactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, il a été prouvé que *Lactobacillus plantarum* présente une activité antimicrobienne. En culture mixte, il réduit considérablement la croissance de *Staphylococcus aureus* de 1.6 Log après 12 heures d'incubation ; après 72 heures d'incubation, aucune croissance n'a été observée.

III.2. Cinétique de croissance et évolution des pH et de l'acidité Dornic pour les *Pseudomonas spp* :

I.3.1. Cinétique de croissance des *Pseudomonas spp* dans le lait stérile et évolution des pH et de l'acidité Dornic du lait stérile :

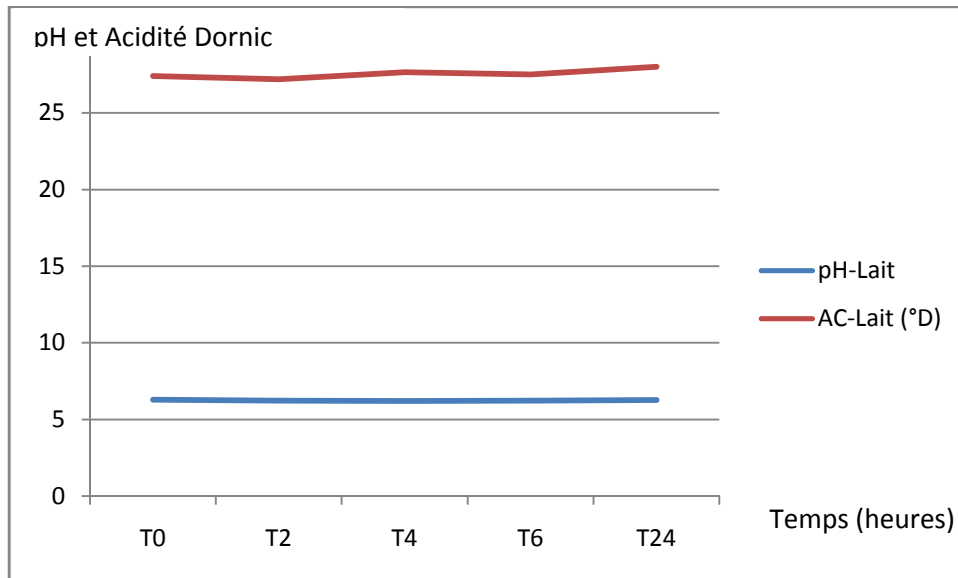


Figure 08 : Courbes de l'évolution des pH et l'acidité Dornic dans le lait stérile.

La figure 08 montre que l'acidité Dornic du lait est en augmentation constante alors que le pH diminue jusqu'à T4 avec une légère augmentation à T6 et T24. Ces deux dernières valeurs sont aberrantes. Cette situation traduit l'effet acidifiant des *Pseudomonas spp* dans le lait stérile.

III.3.1. Cinétique de croissance des *Pseudomonas spp* dans le lactosérum stérile et évolution des pH et de l'acidité Dornic du lactosérum stérile :

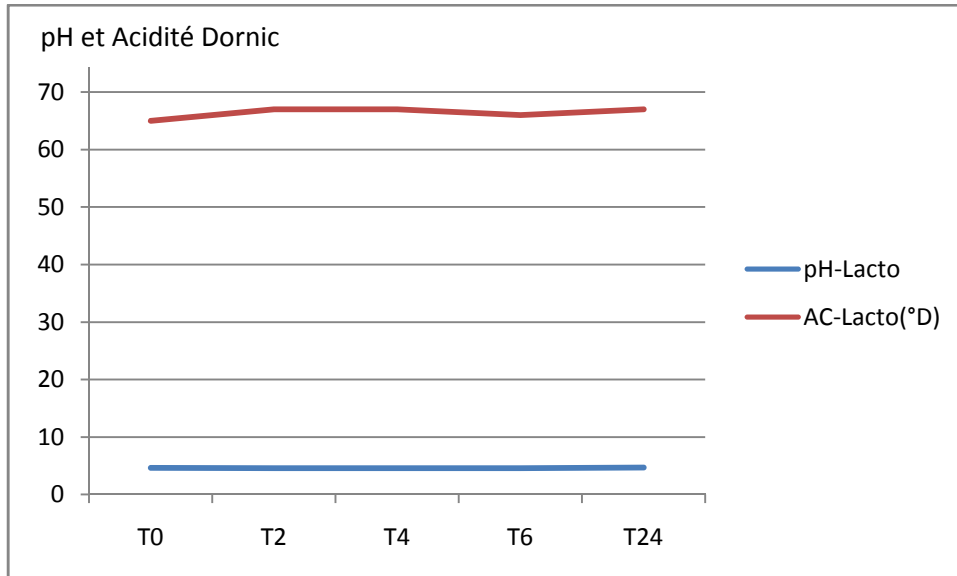


Figure 09: Courbes de l'évolution des pH et l'acidité Dornic dans le lactosérum stérile.

La figure 09 montre que l'acidité Dornic du lactosérum est en augmentation constante alors que le pH diminue jusqu'à T 4 avec une légère augmentation à T6 et T24. Ces deux dernières valeurs sont aberrantes. Ceci peut être dû à un mauvais étalonnage du pH-mètre. Cette situation traduit l'effet acidifiant des *Pseudomonas spp* dans le lactosérum stérile.

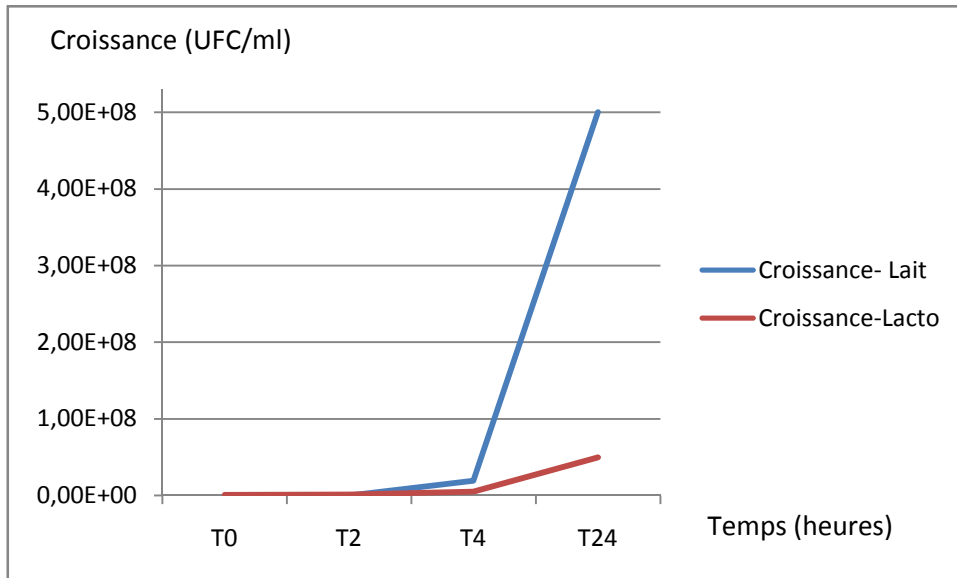


Figure 10 : Courbes de croissance des *Pseudomonas* spp dans le lait et le lactosérum.

Cette figure montre que la cinétique de croissance de *Pseudomonas* spp est plus importante dans le lait qui atteint la valeur de $5 \cdot 10^8$ UFC/ml à T24 alors que dans le lactosérum elle n'atteint que la valeur de $5 \cdot 10^7$ au bout du même temps. Ceci pourrait être dû à l'acidité du lactosérum qui est moins riche que le lait.

III.3. Antibiogrammes :

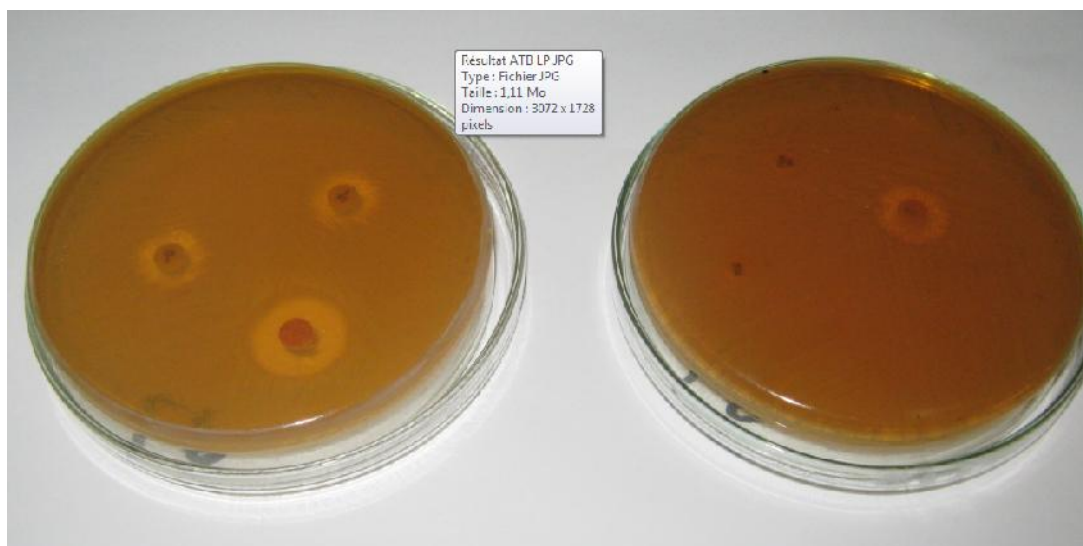


Figure 11 : Résultat de l'antibiogramme de *Lb. plantarum*

La figure 11 montre le résultat de l'antibiogramme de *Lb. plantarum* qui n'a révélé que quatre zones d'inhibition dont seulement une traduit une sensibilité à la Spiramycine (1.1mm de diamètre).

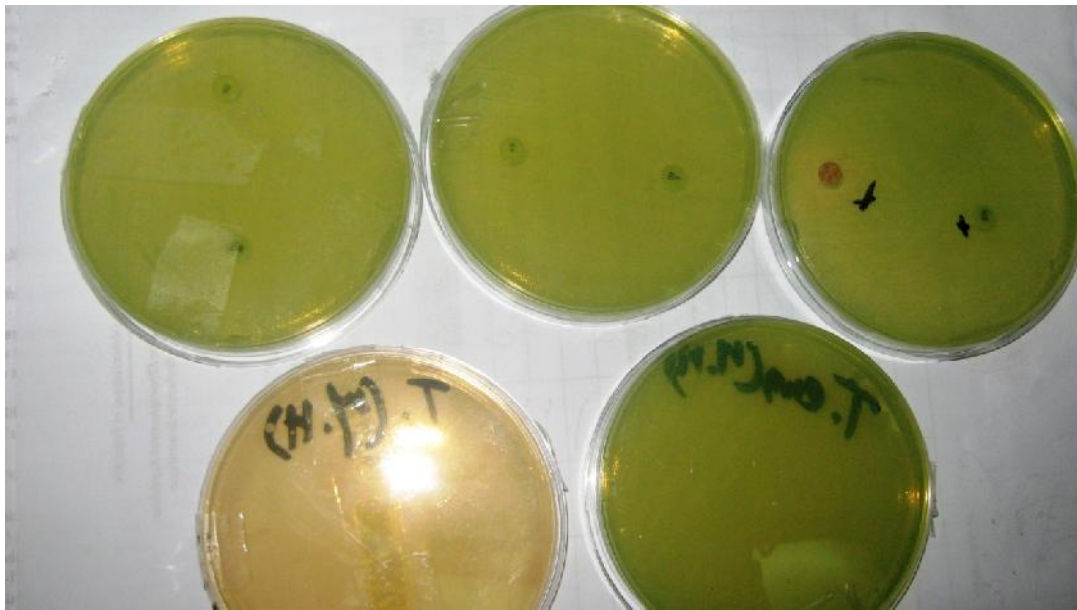


Figure 12: Résultats de l'antibiogramme des *Pseudomonas spp*

La figure 12 montre le résultat de l'antibiogramme des *Pseudomonas spp* qui n'a révélé aucune zone d'inhibition. Cela signifie que les *Pseudomonas spp* sont résistants aux antibiotiques utilisés (Ampicilline, céphalosporine, Spiramycine, céphotoxine , vancomycine et oxacilline).

III.4. Evolution des poids et du pH des fromages et croissance des *Pseudomonas spp* dans les fromages :

I.4.1. poids des fromages

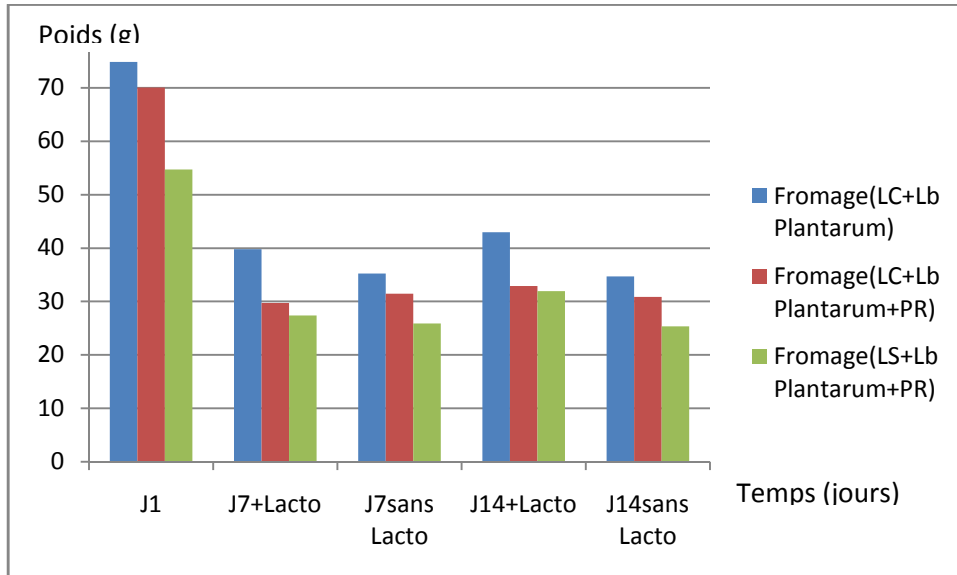


Figure 13: Histogramme de l'évolution des poids des fromages

Les trois fromages retenus ont été pesés à la fabrication (jour 1). Les rendements fromagers sont reproduits dans le tableau ci-après :

Tableau III : Rendements fromager des fromages retenus

Technologie des fromages	Rendements fromager à la fabrication (g/l)
Fromage au lait cru de chèvre + <i>Lb. plantarum</i>	249.3
Fromage au lait cru de chèvre + <i>Lb. plantarum</i> + présure	233.4
Fromage au lait stérile de chèvre + <i>Lb. plantarum</i> + présure	182.3

Au 7^{ème} jour, les différents fromages sont découpés en deux portions. Les deux portions de chaque fromage ainsi obtenus sont pesées ; l'une sera immergée dans le lactosérum et l'autre est laissée comme telle en barquette.

III.4.2. pH des fromages :

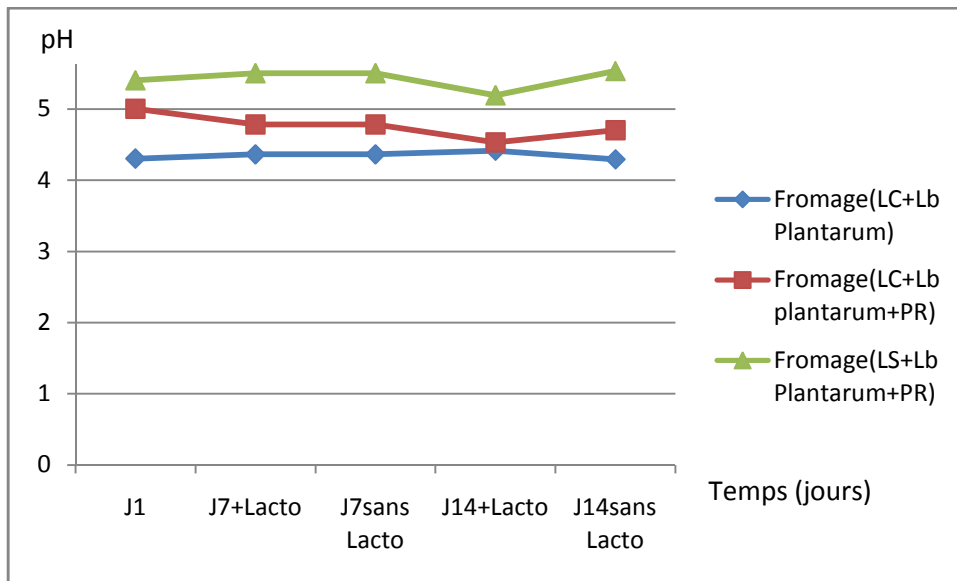


Figure 14 : Courbe représentant l'évolution des pH des fromages

A la fabrication, le pH est plus élevé dans le fromage (lait stérile +*Lb. plantarum* +présure) que dans les fromages au (lait cru + *Lb. plantarum* + présure). Ce dernier à un pH plus élevé que celui du fromage au lait cru + *Lb. plantarum*.

Au 7^{ème} jour, on effectue une mesure du pH des fromages avant de les découper en deux portions dont l'une sera immergée dans le lactosérum et l'autre est laissée comme telle en barquette.

On remarque que le pH des fromages plongés dans le lactosérum (lait stérile +*Lb. plantarum* +présure) et (lait cru + *Lb. plantarum* + présure) diminue au 14^{ème} jour, alors que celui des mêmes fromages témoins (fromages en barquette) reste stable. Pour le fromage (lait cru + *Lb. plantarum*), qu'il soit conservé ou non dans le lactosérum, le pH reste pratiquement stable.

III.4.3 Croissance des *Pseudomonas spp* dans les fromages :

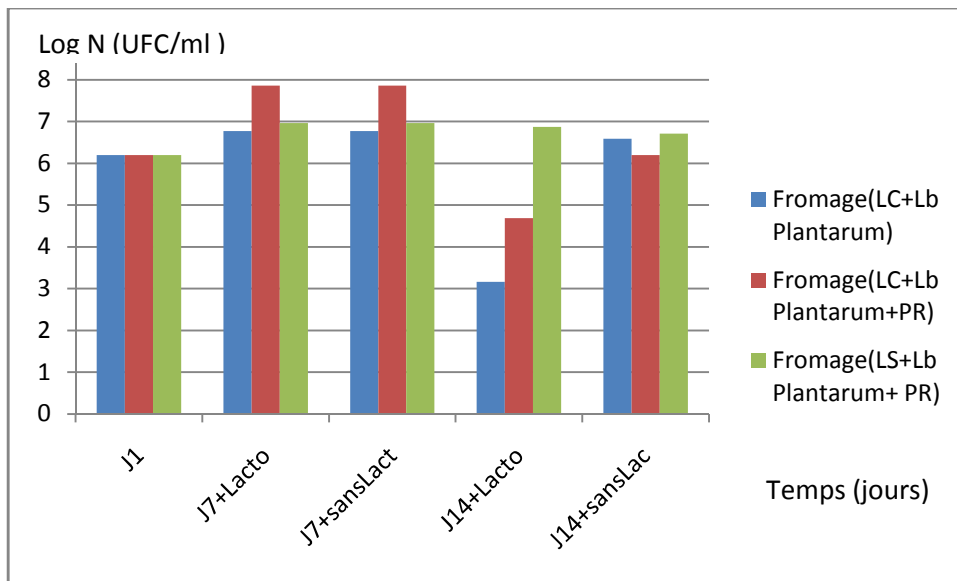


Figure 15: Histogrammes représentant la croissance des *Pseudomonas spp* dans les fromages.

Au jour 1 de la fabrication, on injecte dans chaque type de fromage à l'aide d'une seringue 1.66×10^6 UFC/ml de *Pseudomonas spp*.

Au 7^{ème} et 14^{ème} jour, on effectue le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les fromages conservés dans le lactosérum et dans les fromages témoins.

On remarque au 7^{ème} jour un très net développement des *Pseudomonas spp* dans le fromage (lait cru + *Lb. plantarum* + présure). Alors que les fromages (lait stérile + *Lb. plantarum* + présure) et (lait cru + *Lb. plantarum*) beaucoup moins contaminés.

Au 14^{ème} jour, on remarque un taux des *Pseudomonas spp* nettement inférieur à la quantité de départ injectée dans les fromages au lait cru conservés dans le lactosérum. Les mêmes fromages mis en barquettes enregistrent aussi une réduction de la contamination par les *pseudomonas spp* mais qui demeure supérieure à la quantité des *pseudomonas spp* inoculée.

Dans le fromage au lait stérile, la contamination accuse une légère diminution par rapport au taux de contamination relevé au 7^{ème} jour

La meilleure réduction des *Pseudomonas spp* dans les fromages au lait cru conservés dans le lactosérum s'explique par le fait que *Lb. plantarum* agit mieux avec le concours de la flore lactique et dans le lactosérum.

Selon Leriche et Fayolle (2011), la contamination par les *Pseudomonas spp* en cœur des fromages frais au lait cru de chèvre (picodon) prélevés en point de vente est de $5.3 \cdot 10^7$ UFC/g et elle est de $1.3 \cdot 10^8$ UFC/g en croûte des mêmes fromages.

Conclusion

Conclusion

Ce travail avait pour objectifs la sélection d'une bactérie lactique antagoniste des *Pseudomonas spp* contaminants des fromages frais de chèvre. Après ce criblage, on étudiera le comportement de la bactérie retenue dans les fromages frais de chèvre contaminés par *Pseudomonas spp*.

Un autre objectif est d'optimiser l'activité antibactérienne de cette bactérie dans les fromages conservés dans le lactosérum.

Le test des spots a permis la sélection de la bactérie *Lactobacillus plantarum* qui présente une meilleure activité antibactérienne que *Lactococcus lactis* vis-à-vis des *Pseudomonas spp*.

La cinétique de croissance et l'évolution des pH et acidité Dornic a révélé un meilleur développement des *Pseudomonas spp* dans le lait stérile que dans le lactosérum stérile ; de même que *Lactobacillus plantarum* a un meilleur développement dans le lait stérile que dans le lactosérum stérile qui traduit des capacités acidifiantes et aromatisantes recherchées.

L'expérience menée sur les trois fromages utilisés a montré que *Lactobacillus plantarum* parvient avec le concours des bactéries lactiques (fromage au lait cru) à réduire la contamination des fromages par les *Pseudomonas spp*.

Au bout d'une semaine de conservation des fromages dans le lactosérum on constate :

- Une stabilité de l'acidité à pH moyen de 4.84
- Une réduction de la contamination par les *Pseudomonas spp* en deçà du seuil de contamination initiale dans les fromages au lait cru.

A travers les résultats obtenus il apparaît que *Lactobacillus plantarum* constitue un bon auxiliaire pour lutter contre les *pseudomonas spp* contaminants des fromages de chèvre.

Aussi cette étude a révélé que le lactosérum peut être récupéré pour assurer la conservation des fromages et optimiser l'action antagoniste de *Lactobacillus plantarum* vis à vis des *pseudomonas spp*.

Cette étude mérite d'être reprise et approfondie par des travaux complémentaires afin de :

- Déterminer la nature de la substance inhibitrice sécrétée par *Lactobacillus plantarum* et étudier la possibilité d'optimiser sa production
- Déterminer la nature des constituants du lactosérum qui migrent dans les fromages
- Rechercher une bactérie lactique ayant un effet synergique avec *Lactobacillus plantarum* pour éradiquer l'effet contaminant des *pseudomonas spp.*

Références bibliographiques

A

Alais C. (1981). La valorisation du lactosérum, les bases et les problèmes. Techniques laitières : 7-10.

Alais C. (1975). Principes des techniques laitières, sciences du lait. 3ème édition. Masson. Paris.

B

Barral J., Doutarte E., Laithier C. (2011). Effet de la prématuration du lait cru de chèvre sur sa microflore et sur l'acidification en fabrication lactique fermière. Renc. Rech. Ruminants. 4, 377-380.

Berdague, J.L., Grappin, R., Chaillet, B., Clement, J.F., (1990). Sensory analysis of French emmentale - grand-cru. *Lait* **70**, 133-145.

Branger A., Richer M.M. et Roustel S., (2007). Microbiochimie et alimentation. *Educagri Edition*.166-168.

C

Centre Fromager de Carmejane., (2004). L'accident du Fluo (ou *Pseudomonas fluorescens*), 2.

Chabanon A., Pougheon M., (2010). Guide du producteur-fromager : L'accident du *Pseudomonas Fluorescens*. Fédération régionale des syndicats caprins Poitou-Charentes / Vendée FRESYCA. 7.

Chabanon A., (2011). Technologie : quand les fromages virent au rose. La feuille des fromagers de Charentes-Poitou. N6. 2P.

Chamba F.J., (2008). Application des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*.Paris. 787-813.

Chatelin, Y.M., Richard, J., (1981). Sources of bacterial contaminations of raw-milk in the farm. *Lait* 61P, 80-94PP.

Cuviller D., (2006). L'accident du rouge sur la surface des fromages lactiques. centre fromager de bourgogne. 5P.

D

Dellaglio F., de Roissard H., Torriani S., Curk M.C. et Janssens D., (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In* : Bactéries lactiques (De Roissard H. et Luquet F.M.). *Lorica, Uriage*. 1 : 25-116.

Demarigny, Y., Beuveier, E., Buchin, S., Pochet, S., Grappin, R., (1997). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .2. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77, 151-167.

Desmasures, N., Radiguet, S., Lejeune, J., Gueguen, M., (1995). Effect of ripening on the microbiological profile of high-quality raw-milk for cheese-making. *Milchwissenschaft- Milk Science International* 50, 193-195.

Desmasures, N., Opportune, W., Gueguen, M., (1997). *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *International Dairy Journal* 7, 643-646.

Desmazeaud M. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait* 63, 267-316.

Dryer J. (2001). La grande diversité du lactosérum. *Dairy foods*. 102(5): 35-41.

E

Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26, 228-231.

Eyquem A., alouf J. montagnier L. (2000). *Traité de microbiologie clinique. Deuxième mise à jours et compléments*. Ed piccin., Italie.

Ezeby JP., abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'école nationale vétérinaire de Toulouse. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/pseudomonadales.html> (consulté le 15 mars 2013).

Ezeby JP.,(2005). abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'école nationale vétérinaire de Toulouse
[.http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/pseudomonadales.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/pseudomonadales.html) (consulté le 15 mars 2013).

G

Galzy P., (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires., Ed l'usine. Paris

Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., Feligini, M., (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 130, 188-195.

Gobin F., Surgères E., (2008). Technique : conférence sur le croûtage des fromages de chèvre. *Revue des ENIL*. 3, 16-18.

Guiraud J.P. et Rosec J.P., (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *AFNOR*. 652P, 237-251

H

Hadef S., (2012). Evaluation des aptitudes technologiques et probiotiques des bactéries lactiques locales. Thèse de magister de microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbeh-Ouargla. 88P.

Hassan A.N. et Frank J.F., (2001). Starter Cultures and their use. *In: Applied Dairy Microbiology*(Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., *Marcel Dekker, Inc.* New York. 151-205.

Hogg T.,(2005). *Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd.* 188-190.

J

Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G., (2006). Science des aliments : Technologie des produits alimentaires. *Tec & Doc, Lavoisier*, Paris. **2** : 40-55.

K

Khalid N.M. et Marth E.H., (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* **73** : 158-167.

Kosikowski F.V. (1979). Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. *Rev. Laitière Française* : 11-21.

L

Laba D., (2004). Etude de la production et de la transformation du lait de chèvre dans les niayes (Senegal). Mémoire de diplôme d'études approfondies de production animale. Université Cheikh Anta Diouf de Dakar. 29p.

Laithier, C., Chatelin, Y.M., Tormo, H., Barral, J., Tormo, H., Morge, S., Lefrileux, Y., Gauzere, Y., Thomas, A., (2004). Identifier les facteurs ayant une incidence sur l'acidification des laits dans les technologies fromagères fermières (caillés lactiques) utilisant du lactosérum en tant que ferment afin d'en améliorer la maîtrise. Edition Technipel 2005, collection résultats. Compte rendu final, 77 p.

Laplanche J. (2004). Système d'épuration du lactosérum d'alpage par culture fixée sur lit de compost. *Rev. suisse Agric.* **36(5)**: 220-224.

Leclerc H., Gaillard F L. et Simonet M., 1994. Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. *DOIN*. Paris. 445.

Le mens. P., Lefrileux Y. Sauvage JP., (2004)., étude d'un accident de fromagerie : odeur, amertume, coloration, dû à *Pseudomonas*. insitut de l'élevage-station expérimentale caprine du Pradel, 1.

Lemieux, L., Simard, R.E., (1991). Bitter flavor in dairy-products .1. a review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* **71**, 599-636.

Leriche, F., Bordessoules, A., Fayolle, K., Karoui, R., Laval, K., Leblanc, L., Dufour, E., (2004). Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods* 59, 33-41.

Leriche F., Fayolle K., (2011). *Pseudomonas* (perfectionnement des techniciens : produits laitiers fermiers), 16P.

Luquet F.M. et Corrieu G.,(2005). Bactéries lactiques et probiotiques. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 3-37

M

Mahaut M., Jeantet R. et Brule G., 2000. Initiation à la technologie fromagère. *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 154-180.

Mami A., Hamedi A.R., Henni J.E. Kerfouf A. et Kihal M. (2010). Activité Anti-Bactérienne de *Lactobacillus plantarum* isolée du lait cru de chèvre d'Algérie vis à vis de *Staphylococcus aureus*. les technologies de laboratoire 5 (21): 26-32.

Masle I., Morgane F., (2001). Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques-Facteurs de variation liés à la composition du lait. *Lait* 81, 561-569.

Molin G.(2006) *Lactobacillus plantarum* 29 3w. proviva.com/ upload/ pdf/ Dokumentation.pdf

Morge S., (2011)., *Pseudomonas*, comment t'éviter. PEP caprin Innimond. 8.

Morge S., (2011)., gestion de la contamination de l'eau par « pseudomonas fluorescens », pep caprin, 2.

P

PEP Caprin., (2012). La flore des trayons des chèvres. Transformation fromagère. 1.

Pilet M.F., Magras C., Federigh M., 2005. Bactéries lactiques. *In : bactériologie alimentaire Federighi M.). 2e Ed., Economica*. Paris. 219-240.

Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Kersters K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** : 213-222.

Pot B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris.1-106.

R

Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D.L., de Vos W.M. et Vaughan, E.E., 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Env. Microbiol.* **68** : 1882–1892.

Raynaud S., Perrin R., Cocaign-Bousquet M. et Loubière P., 2003. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *App. Env. Microbiol.* **71**(12) : 8016-8023.

Reveneau N. (2001). vaccination par voie muqueuse: utilisation de lactobacillus plantarum et bordetella pertusis comme vecteurs vivants de contamination. Thèse de doctorat en sciences de la vie. Université des sciences et technologies de lille.

S

Saad N., (2010). Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus Plantarum 299v* avec l'hôte : approche in vitro. Thèse de Doctorat de Biologie-santé. Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques. 221 P.

Sauris Y., (1973). Fromages de chèvre. Mémoires originaux. Le lait 8, 309-316.

Sharpes, M., (1981), the genus lactobacillus. In: A handbook in habitats. Isolation and identification of bacteria. M. P. starr, H. stolp, H.G. truper, A. ballows and H.G. schel gel ED springer ., new york PP 1653-1679

Sirilun S., Chaiyasut C. , Kantachote D. et Luxananil P. (2010). Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. African Journal of Microbiology Research. 4 (10) : 994-1000

Souid W., (2011). Effet des bactériocines (type nisine) produite pas une souche lactique isolée a partir du fromage camelin, sur une souche psychrotrophe. Thèse de Magister de Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

St-Gelais D., Tirard-Coller P., Bélanger G., Couture R. et Drapeau R., 2002. Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). *Presses. Int. Polytechnique*. 349-407.

T

Tamime A.Y., 2002. Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). *3e Ed., John Wiley and Sons, Inc.*, New York. 261-366.

Tormo H. (2010). diversité des flores microbiennes des laits cru de chèvre et facteurs de variabilité. thèse de doctorat de l'université de toulouse. 46, 256p.

V

Veissyere R. (1975). Technologie du lait. Edition Masson Rustique. Paris.

Vignola C. (2002). sciences et technologies du lait : transformation du lait. Ed : ISBN. Paris. France.

Z

Zaller B., 2005, le fromage de chèvre: spécificité technologique et économique, Toulouse, 78P, 31-46

Annexes

Annexe I : Résultats

Tableau I : Résultats des mesures du test des spots

	Diamètre total (cm)	Taille du spot (cm)	Diamètre de la zone d'inhibition (cm)
<i>Lb. plantarum</i>	3.8	1.4	2.4
<i>Lactococcus lactis</i>	3.0	1.1	1.9

Tableau II. : Evolution de l'acidité titrable et du pH pour *Pseudomonas spp*

<i>Pseudomonas spp</i>		T0	T2	T4	T6	T24
Lait stérile (200ml)	pH	6.29	6.22	6.2	6.22	6.27
	Acidité	27.4°D	27.2°D	27.66°D	27.6°D	28°D
Lactosérum stérile(200ml)	pH	4.63	4.60	4.57	4.59	4.70
	Acidité	65°D	67°D	67°D	66°D	67°D

Tableau III : Résultats de dénombrement des *Pseudomonas spp* dans 200 ml de lait stérile :

Temps en heures	Croissance UFC/ml
T0	8×10^4
T2	1.1×10^5
T4	1.95×10^7
T24	5×10^8

Tableau IV : Résultats de dénombrement des *Pseudomonas spp* sur 200ml de lactosérum stérile :

Temps en heures	Croissance UFC/ml
T0	7.75×10^5
T2	1.1×10^6
T4	0.5×10^7
T24	5×10^7



Résultats des analyses du lait cru de chèvre (physicochimie et microbiologie)

1) Résultats physicochimiques :

Les laits utilisés avaient en moyenne un pH de 6.54 et une Acidité de 28°D

2) Résultats microbiologiques :

Tableau V : Résultats de l'analyse microbiologique du lait cru de chèvre

Microorganisme	Résultat (UFC/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5×10^1
Coliformes	1.5×10^2
Coliformes fécaux	0.5×10^3
Flore lactique	3×10^4
FMAT	2.93×10^6
Salmonelles	Absence

Résultats du suivie des fromages (pH, poids et croissance des *Pseudomonas spp*)

Résultats au 1^{er} jour de fabrication :

1) Poids des fromages

Tableau VI : Résultats du poids des fromages au 1^{er} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i>	Fromage sans <i>Pseudomonas spp</i>	Moyenne
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	76.94g	72.68g	74.87g
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	64.97g	75.80g	70.085g
Lait de chèvre stérile + <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> + présure	54.84g	54.62g	54.73g



2) pH des fromages

Tableau VII : Résultats des pH des fromages au 1^{er} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i>	Fromage sans <i>Pseudomonas spp</i>	Moyenne
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	4.35	4.25	4.30
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	4.74	5.25	5.0
Lait de chèvre stérile + <i>Lb. plantarum</i> + présure	5.37	5.47	5.4

3) résultats de dénombrements

Au 1^{er} jour de fabrication on a inoculés par injection directe dans le cœur des fromages 1.6×10^6 UFC/ml de *Pseudomonas spp*.

Résultats au 7^{ème} jour de fabrication :

1) Poids des fromage

Tableau VIII : Résultats du poids des fromages au 7^{ème} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> + lactosérum	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> sans lactosérum
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	39.81g	35.25g
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	29.72g	31.45g
Lait de chèvre stérile + <i>Lb. plantarum</i> + présure	27.41g	25.91g

2) pH des fromages

Tableau IX : Résultats des pH des fromages au 7^{ème} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> + lactosérum	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> sans lactosérum
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	4.36	4.36
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	4.78	4.78
Lait de chèvre stérile + <i>Lb. plantarum</i> + présure	5.5	5.5



3) Résultats de dénombrements

Tableau X : Résultats des dénombrements (fromages) au 7^{ème} jour de fabrication

Fromages	Croissance des <i>Pseudomonas spp</i>
Fromage 1 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i>)	5.9X10 ⁶ UFC/ml
Fromage 2 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + présure)	7.4X10 ⁷ UFC/ml
Fromage 3 (lait stérile + <i>Lb.plantarum</i> + présure)	9.2X10 ⁶ UFC/ml

Résultats au 14^{ème} jour de fabrication :

1) Poids des fromage

Tableau XI: Résultats du poids des fromages au 14^{ème} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> + lactosérum	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> sans lactosérum
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	42.94g	34.67g
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	32.92g	30.87g
Lait de chèvre stérile + <i>Lb. plantarum</i> + présure	31.97g	25.34g

2) pH des fromages

Tableau XII: Résultats du pH des fromages au 14^{ème} jour de fabrication

	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> + lactosérum	Lactosérum	Fromage + <i>Pseudomonas spp</i> sans lactosérum
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i>	4.41	4.49	4.29
Lait de chèvre cru + <i>Lb. plantarum</i> + présure	4.53	4.59	4.70
Lait de chèvre stérile + <i>Lb. plantarum</i> + présure	5.19	4.94	5.53



3) Résultats de dénombrements

Tableau XIII : Résultats des dénombrements (fromages) au 14^{ème} jour de fabrication

Fromages	Croissance des <i>Pseudomonas spp</i>
Fromage 1 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + pseudomonas spp+lactosérum)	1.45X10 ³ UFC/ml
Fromage 2 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + présure+ pseudomonas spp+ lactosérum)	5X10 ⁴ UFC/ml
Fromage 3 (lait stérile + <i>Lb.plantarum</i> + présure+ pseudomonas spp+ lactosérum)	7.5X10 ⁶ UFC/ml
Fromage 4 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + pseudomonas spp)	3.9X10 ⁶ UFC/ml
Fromage 5 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + présure+ pseudomonas spp)	1.6X10 ⁶ UFC/ml
Fromage 6 (lait cru + <i>Lb.plantarum</i> + présure+ pseudomonas spp)	5.15X10 ⁶ UFC/ml



Annexe II : Milieux de cultures

(Guiraud J. et Galzy P., 1980 ; Guiraud J-P., 2003)

Bouillon nutritif

➤ Peptone	10g
➤ Extrait de viande	5g
➤ (éventuellement) NaCl	5g
pH 7.2 Autoclaver 20 minutes à 120°C	

Bouillon cœur cervelle (BHI)

➤ Protéose-peptone	10g
➤ Infusion de cervelle de veau	12.5g
➤ Infusion de cervelle de bœuf.....	5g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Phosphate disodique.....	2.5g
➤ Glucose.....	2g
pH 7.4 Autoclaver 15 minutes à 120°C	

Chapman

➤ Extrait de viande.....	1g
➤ Peptone	10g
➤ Chlorure de sodium.....	5g
➤ Mannitol	10g
➤ Rouge de phénol.....	25mg
➤ Agar	15g
pH 7.4 Autoclaver 15 minutes à 120°C	

Eau physiologique

➤ Chlorure de sodium.....	8.5g
➤ Eau distillée.....	1 L
pH 7 Autoclaver 20 minutes à 120 °C	

EMB (gélose lactosée)

- | | |
|--------------------------------|------|
| ➤ Peptone | 10g |
| ➤ Lactose | 10g |
| ➤ Phosphate bipotassique | 2g |
| ➤ Eosine | 0.4g |
| ➤ Bleu de méthylène | 65mg |
| ➤ Agar | 15g |

pH 7.1 Autoclaver 15minutes à 120 °C

Gélose nutritive ordinaire (GNO)

- | | |
|---------------------------|-----|
| ➤ Peptone | 10g |
| ➤ Extrait de viande | 5g |
| ➤ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ➤ Agar | 15g |

pH 7.2 Autoclaver 20 minutes à 120°C

Giolitti et Cantoni

- | | |
|----------------------------|------|
| ➤ Tryptone | 10g |
| ➤ Extrait de viande | 5g |
| ➤ Extrait de levure | 5g |
| ➤ Chlorure de lithium..... | 5g |
| ➤ Mannitol | 20g |
| ➤ Chlorure de sodium | 5g |
| ➤ Glycine | 1.2g |
| ➤ Pyruvate de sodium..... | 3g |

pH 6.9 Autoclaver 20 minutes à 115°C

*avant emploi rajouter à chaque tube de milieu 0.1 ml d'une solution de tellurite de potassium à 0.5 % stérilisé par filtration.

MRS (bouillon)

- | | |
|--------------------------------|-------|
| ➤ Peptone | 10g |
| ➤ Extrait de viande..... | 10g |
| ➤ Extrait de levure | 5g |
| ➤ Glucose | 20g |
| ➤ Tween 80..... | 1 ml |
| ➤ Phosphate dipotassique | 2g |
| ➤ Acétate de sodium..... | 5g |
| ➤ Citrate triammonique..... | 2g |
| ➤ Sulfate de magnésium..... | 200mg |
| ➤ Sulfates de manganèse..... | 50mg |

pH 6.5 Autoclaver 15 minutes à 120°C

- Ce milieu peut être préparé à double concentration en multipliant par deux les valeurs ci-dessus.

MRS (milieu)

- | | |
|--------------------------------|-------|
| ➤ Peptone | 10g |
| ➤ Extrait de viande..... | 10g |
| ➤ Extrait de levure | 5g |
| ➤ Glucose | 20g |
| ➤ Tween 80..... | 1 ml |
| ➤ Phosphate dipotassique | 2g |
| ➤ Acétate de sodium..... | 5g |
| ➤ Citrate triammonique..... | 2g |
| ➤ Sulfate de magnésium..... | 200mg |
| ➤ Sulfates de manganèse..... | 50mg |
| ➤ Agar (1.5 %). | |

pH 6.5 Autoclaver 15 minutes à 120°C

Mueller-Hinton (gélose pour antibiogramme)

- | | |
|--------------------------------------|-------|
| ➤ Extrait de viande..... | 2g |
| ➤ Hydrolysate acide de caséine | 17.5g |
| ➤ Amidon | 1.5g |
| ➤ Gélose..... | 10g |

pH 7.4 Autoclaver 15 minutes à 115°C

V.R.B.G (milieu)= gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

- | | |
|---------------------------|------|
| ➤ Peptone..... | 7g |
| ➤ Extrait de levure | 5g |
| ➤ Sels biliaires..... | 1.5g |
| ➤ Glucose | 10g |
| ➤ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ➤ Rouge neutre | 30mg |
| ➤ Christal violet | 2mg |
| ➤ Agar | 12g |

pH 7.4 stériliser par 15 minutes d'ébullition. Ne pas autoclaver.

Colorants :**Bleu de méthylène (coloration vitale)**

- | | |
|---------------------------|---------|
| ➤ Bleu de méthylène | 0.2g |
| ➤ Eau distillée | 1 litre |

Fuschine de Ziehl

- | | |
|-------------------------------|-------|
| ➤ Fuschine basique..... | 1g |
| ➤ Alcool éthylique à 90°..... | 10ml |
| ➤ Phénol | 5g |
| ➤ Eau distillée..... | 100ml |
- Pour la coloration de Gram cette solution doit être diluée au 1/15, ou bien le colorant doit être dilué sur la lame (1 goutte de colorant sur la lame recouverte d'eau).

Lugol

- | | |
|----------------------------|-------|
| ➤ Iode | 1g |
| ➤ Iodure de potassium..... | 2g |
| ➤ Eau distillée | 300ml |
- Ce réactif peut être préparé à double concentration

Violet de gentiane

- | | |
|---------------------------|--------|
| ➤ Violet de gentiane..... | 1g |
| ➤ Alcool à 90°..... | 10 ml |
| ➤ Phénol..... | 2g |
| ➤ Eau distillée..... | 100 ml |

Résumé

L'objectif de ce travail est de sélectionner une bactérie lactique antagoniste des *Pseudomonas spp* contaminants des fromages frais de chèvre. Le test des spots a permis la sélection de la bactérie *Lactobacillus plantarum* qui présente une meilleure activité antibactérienne. La cinétique de croissance et l'évolution des pH et acidité Dornic avec *Lactobacillus plantarum* et *Pseudomonas spp* traduisent un meilleur comportement dans le lait stérile que dans le lactosérum stérile. L'expérience menée sur les trois fromages utilisés a montré que *Lactobacillus plantarum* parvient avec le concours des bactéries lactiques (fromage au lait cru) à réduire la contamination des fromages par les *Pseudomonas spp*. A travers les résultats obtenus il apparaît que *Lactobacillus plantarum* constitue un bon auxiliaire pour lutter contre les *Pseudomonas spp* contaminants des fromages de chèvre. Aussi cette étude a révélé que le lactosérum peut être récupéré pour améliorer le poids des fromages, assurer leur conservation et optimiser l'action antagoniste de *Lactobacillus plantarum* vis à vis des *Pseudomonas spp*.

Mots clés : Antagonisme, fromage frais de chèvre, *Lactobacillus plantarum*, lactosérum, *Pseudomonas spp*.

Abstract

The objective of this work was to select lactic acid bacteria antagonist of *Pseudomonas spp* contaminants of fresh goat cheese. The test spots led to the selection of *Lactobacillus plantarum* having a better antibacterial activity. The kinetics of growth and evolution of pH and acidity Dornic with *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas spp* reflect a better performance in the sterile milk than in sterile whey. The experience used on the three cheeses showed that *Lactobacillus plantarum* succeeds with the help of lactic acid bacteria (raw milk cheese) to reduce contamination of cheese by *Pseudomonas spp*. Through the results it appears that *Lactobacillus plantarum* is a good aid to fight against *Pseudomonas spp* contaminants goat cheese. Also, this study showed that whey can be recovered to improve the weight of cheese, preserve them and optimize the antagonistic action of *Lactobacillus plantarum* against *Pseudomonas spp*

Keywords: Antagonism, fresh goat cheese, *Lactobacillus plantarum*, whey, *Pseudomonas spp*.